



Naturalis

Repositorio Institucional
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Estudio y evaluación de los patógenos de cucarachas (Insecta: Blattodea) urbanas en la Provincia de Buenos Aires, como potenciales agentes de control

Gutiérrez, Alejandra Concepción

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: García, Juan José

Co-dirección: López Lastra, Claudia C.

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2015

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20160301001433>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Estudio y evaluación de los patógenos de cucarachas (Insecta: Blattodea) urbanas en la Provincia de Buenos Aires, como potenciales agentes de control

Trabajo de investigación para optar por el título de

Doctor en Ciencias Naturales

Lic. Gutierrez, Alejandra Concepción

Directores: Dr. García, Juan José

y Dra. López Lastra, Claudia C.



2015

A los hombres de mi vida: Lautaro y Dario Fontela

AGRADECIMIENTOS

- A mi hijo Lautaro por ser el amor de mi vida y hacerme feliz día a día. A Dario Fontela porque te amo, y además por la paciencia y compañía en esta etapa, y por realizar el diseño y los dibujos de la tesis.
- A mis familiares en especial a mi mamá Cristina y a mi papá Esteban por su apoyo incondicional y amor; a mis hermanos Daniela y Esteban, a mí cuñado Ramiro, mis sobrinos Ramiro y Paulina por estar siempre a mi lado. A mi familia política Diego, Valeria, Silvio a mis sobrinos Benjamin y Oriana, a mi suegra Elsa y a Silvano por su interés y ayuda en esta etapa.
- A mis directores, Dra. Claudia López Lastra y al Dr. Juan José García, por acompañarme en este proceso, por sus innumerables aportes, desde la investigación y desde la amistad y por haber confiado siempre en mí.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio de hongos en el CEPAVE: Celeste D'alexandro, Romina Manfrino, María Elena Schapovaloff, Julieta Tornesello, Evangelina Muttis, Manuel Rueda Páramo, João Antônio R. Machado, Eliana Ordoqui y Mariana Dellapé que fueron una excelente compañía y ayuda en todo momento.
- A todos los integrantes del CEPAVE que de una u otra manera me ayudaron y compartieron conmigo el desarrollo de las tareas de investigación, en especial a Jorge Barneche, Luis Giambelluca, y Emilio topa.
- Al Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), y a su directora Dra. Alda, González, y a la co-directora, Dra. Graciela, Navone, por haberme permitido la realización de mis tareas de investigación en dicho centro.
- Al Prof. Dr. Christian Luz, por ayudarme y acompañarme en mi estadía en la ciudad de Goiania Brasil, y a mis compañeros del Laboratorio de Patología de Invertebrados, del Instituto de Patología Tropical y Salud Pública, de la Universidad Federal de Goiás.
- A los investigadores y profesores de otras instituciones nacionales y extranjeras, como el Dr. Raul Alzogaray, la Ing. Agr. María Inés Urrutia, al Dr. Francisco A Crespo, a la Lic. Alejandra del Carmen Valverde, a la Lic. Noelia Guzmán, al

Dr. Walter Rossi, al Dr. Richard Clopton, y al Dr. Sanscraint Neil, por su ayuda y colaboración en la identificación del material y análisis de los resultados.

- A Lic. Mariana Pennisi, a la Ing. Q. Graciela Peterson y al Ing. Luis Hector Perego del instituto de Prevención del Infarto en Argentina PROPIA - UNLP - CIC Bs.As .
- Agradecer a la Comisión de Investigación Científicas (CIC) de La provincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar mi estudio de posgrado mediante el otorgamiento de las becas, y a la Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP-FCNYM) por la formación recibida. Por otro lado, agradecer a la Secretaria de Políticas Universitarias (Ministerio de Educación de la Nación) en cooperación con CAPES MERCOSUR por financiación del viaje de estudio realizado.

Indice

AGRADECIMIENTOS.....	3
.....	10
RESUMEN Y ABSTRACT	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES Y MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	19
ANTECEDENTES	20
Biología y comportamiento de las principales cucarachas plagas en la República Argentina.	20
Familia Blattellidae	21
Familia Blattidae.....	22
Familia Blaberidae	25
La cucaracha como vector mecánico, alergias y entomofobia	26
Manejo de las poblaciones de cucarachas.....	27
Control químico	27
Resistencia a los insecticidas: problemática a nivel mundial y en Argentina	30
Control cultural y planes de manejo integrado de plagas (MIP).....	31
Control biológico	32
Parasitoides y depredadores.....	33
Nematodos.....	34
Protistas.....	35
Virus.....	36
Bacterias.....	36
Hongos.....	38
HIPOTESIS	39
EL OBJETIVO GENERAL	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	41
Áreas de recolección de cucarachas y transporte de los insectos	41
Mantenimiento en el laboratorio de los insectos recolectados	43
Instalación y mantenimiento de colonias de cucarachas en el laboratorio.....	43

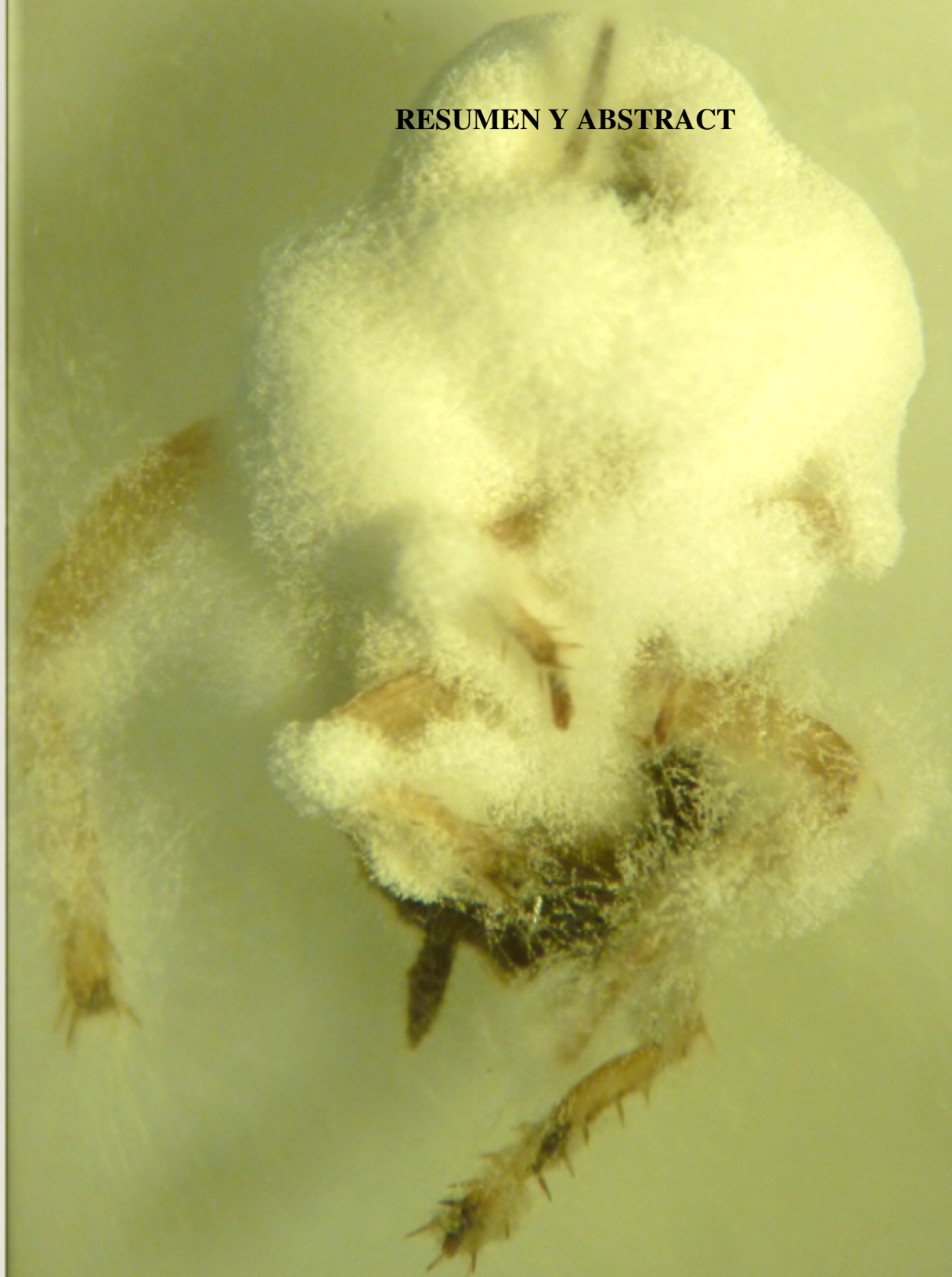
Identificación de los ejemplares recolectados.....	45
Metodología para la detección, aislamiento e identificación de parásitos y patógenos....	45
Disección de las cucarachas	46
Examen microscópico de los insectos	47
RESULTADOS GENERALES.....	48
Áreas de recolección de cucarachas	48
Parásitos y patógenos hallados en cucarachas	49
BIBLIOGRAFÍA	52
CAPÍTULO II: PROCESAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE PROTISTAS PARÁSITOS DE CUCARACHAS.	
.....	66
INTRODUCCIÓN	67
OBJETIVO	68
MATERIALES Y MÉTODOS.....	68
RESULTADOS	75
Superfamilia Gregarinoidea Chakaravarty, 1960 Emend. Clopton, 2009 (= Gregarinicae Chakaravarty, 1960).	75
Familia Blabericolidae Clopton, 2009.....	75
Género Blabericola Clopton, 2009	75
Género Protomagalhaensia Pinto, 1918 sensu Clopton, 2009	77
Familia Gregarinidae Labbé, 1899.....	86
Género Gregarina Dufour, 1828 (= Degiustia Levine, 1979 [in part]) (= Erhardovina Levine, 1985 [in part])	86
DISCUSIÓN.....	92
BIBLIOGRAFIA	95
CAPÍTULO III: PROTISTA ESPOROGÉNICO.....	100
INTRODUCCIÓN	101
OBJETIVO	102
MATERIALES Y MÉTODOS.....	102
RESULTADOS	102
Descripción de un Protista esporogénico en <i>Blatta orientalis</i>	102
DISCUSIÓN.....	104
BIBLIOGRAFÍA	106
CAPÍTULO IV: IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO <i>WOLBACHIA</i> EN CUCARACHAS ..	109
INTRODUCCIÓN	110
OBJETIVO	110

MATERIALES Y MÉTODOS.....	110
Identificación de <i>Wolbachia</i> sp. por medio de técnicas moleculares.....	110
Extracción del ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico	111
Cuantificación del ADN.....	112
Amplificación del ADN por PCR.....	112
RESULTADOS	113
Cuantificación del ADN.....	113
Visualización del resultado por PCR de los genes de <i>Wolbachia</i> sp.:	115
DISCUSIÓN.....	116
BIBLIOGRAFÍA.....	117
CAPÍTULO V: NEMATODOS DE CUCARACHAS.....	119
INTRODUCCIÓN	120
OBJETIVOS	121
MATERIALES Y MÉTODOS.....	121
Identificación y caracterización de los nematodos por medio de caracteres morfométricos	122
Parámetros cuantitativos de las poblaciones de nematodos:	123
Preparación de muestras de nematodos para microscopia de barrido (MEB):.....	124
Identificación y caracterización de los nematodos por medio de técnicas moleculares..	125
Extracción del ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico	125
Cuantificación del ADN.....	127
Amplificación del ADN por PCR.....	127
Secuenciación y análisis filogenético	129
RESULTADOS	131
Caracterización morfológica y morfométricas de los nematodos hallados en <i>Periplaneta fuliginosa</i>	131
Características del Género <i>Leidynema</i> Schwenk (Travassos, 1929).....	132
<i>Leidynema appendiculata</i> (Leidy, 1850) Chitwood, 1932.	133
Características del Genero <i>Hammerschmidtella</i> Chitwood, 1932	140
<i>Hammerschmidtella</i> sp.....	140
Parámetros cuantitativos de las poblaciones de parásitos presentes en <i>P. fuliginosa</i> : ..	145
Identificación molecular de los nematodos parásitos.	145
DISCUSIÓN.....	148
BIBLIOGRAFIA.....	153
CAPÍTULO VI: HONGOS PARÁSITOS Y PATÓGENOS EN CUCARACHAS.....	157

INTRODUCCIÓN	158
OBJETIVOS	160
MATERIALES Y METODOS.....	161
Aislamiento y caracterización de hongos parásitos de cucarachas.	161
Relevamiento e identificación de hongos patógenos de cucarachas	161
Aislamiento y caracterización de hongos patógenos de cucarachas.....	162
Aislamiento a partir del insecto infectado	162
Aislamientos monospóricos	163
Procedimientos con cultivos fúngicos y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos.....	163
Descripción macroscópica.....	164
Descripción microscópica.....	166
Análisis estadísticos.....	166
Preservación de los cultivos fúngicos.....	166
En glicerol 10 % estéril	167
En agua destilada estéril	167
En papel de filtro esterilizado	167
Transferencias en cultivo o “repiques” sucesivos.....	167
Evaluación de la patogenicidad de los hongos entomopatógenos.....	167
Cría de insectos para Bioensayos	168
Cultivo fúngico y preparación del inóculo.....	168
Evaluación de la patogenicidad de <i>M. anisopliae</i> aislados de cucarachas.	169
Evaluación de la patogenicidad de las cepas de hongos entomopatógenos aisladas de otros insectos, sobre cucarachas	170
Efecto del cebo formulado con <i>M. anisopliae</i> sobre ninfas y adultos de <i>B. germanica</i>	172
Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀) y del tiempo letal medio (TL ₅₀) de <i>M. anisopliae</i> sobre cuatro especies de cucarachas.	172
Análisis estadístico	174
Inyección de blastosporas de <i>M. anisopliae</i> a ninfas de <i>P. americana</i>	175
Pruebas preliminares para la producción masiva de hongos entomopatógenos y su. uso en cebos para control de cucarachas.....	178
Estimación de la composición de los ácidos grasos cuticulares de cinco especies de cucarachas por cromatografía gaseosa.....	180
RESULTADOS.	181
Aislamiento y caracterización de hongos parásitos de cucarachas.	181

Relevamiento e identificación de hongos patógenos de cucarachas	186
Aislamiento y caracterización de hongos patógenos de cucarachas.....	188
Caracterización morfológica de hongos entomopatógenos.....	189
Evaluación de la patogenicidad de <i>M. anisopliae</i> aislados de cucarachas.	193
Evaluación de la patogenicidad de las cepas de hongos entomopatógenos, aislados de otros insectos, sobre cucarachas	194
Efecto de los tratamientos de contacto directo y cebo sobre ninfas y adultos de <i>B. germanica</i>	195
Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀) y del tiempo letal medio (TL ₅₀) de <i>M. anisopliae</i> sobre ninfas y adultos de cuatro especies de cucarachas.	199
Inyección de blastosporas de <i>M. anisopliae</i> a ninfas de <i>P. americana</i>	208
Pruebas preliminares para la producción masiva de hongos entomopatógenos y su uso en cebos para control de cucarachas.....	211
Determinación por cromatografía gaseosa de los ácidos grasos cuticulares de cinco especies de cucarachas.	212
DISCUSIÓN.....	218
BIBLIOGRAFÍA.....	222
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	228
ANEXO	231

RESUMEN Y ABSTRACT



RESUMEN

Las cucarachas presentan una distribución mundial, hay descritas aproximadamente 4000 especies, sin embargo solo el 1% de las especies de cucarachas conocidas son consideradas plagas para el hombre. Las cucarachas domiciliarias y peridomiciliarias sobreviven bien en asociación con cualquier asentamiento humano que proporcione calor, humedad y alimento. En Argentina hay descritas 90 especies de cucarachas y las consideradas plaga para el hombre son la cucaracha alemana, *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Blattellidae); cucaracha americana, *Periplaneta americana* (L.) (Blattodea: Blattidae); cucaracha marrón ahumada, *Periplaneta fuliginosa* (Serville) (Blattodea: Blattidae); cucaracha oriental, *Blatta orientalis* (L.) (Blattodea: Blattidae). Las cucarachas tienen un impacto económico y médico significativo, contaminan los alimentos y otras materias primas. Además pueden actuar como vectores mecánicos de diferentes patógenos, pueden contribuir a aumentar los procesos alérgicos y son considerados agentes de inducción y exacerbación del asma principalmente a través de sus heces y mudas.

El costo para el control de las cucarachas puede convertirse en una carga significativa en el tiempo, y el uso de insecticidas para su control puede generar un problema para la salud humana. A lo largo de los años el control se centró en el uso sistemático y preventivo de insecticidas químicos y diversos estudios han demostrado que las cucarachas tienen la capacidad para desarrollar resistencia a la mayoría de los insecticidas en uso a gran escala. Actualmente, se busca un enfoque integrado a través del manejo integrado de plagas (MIP). El hecho de poder diseñar metodologías eficientes de control de cucarachas en las cuales se incorporen patógenos permitirá reducir las cantidades de insecticidas neurotóxicos utilizados y lograr aceptables niveles de control persistentes en el tiempo. El objetivo de este trabajo fue desarrollar estrategias compatibles con el ambiente tendiente a lograr la reducción de la densidad de cucarachas en ambientes urbanos mediante el empleo de organismos patógenos.

En primer lugar, se realizó una prospección de cucarachas en busca de patógenos. Se recolectaron varias especies de cucarachas y se inició la cría en el laboratorio del

CEPAVE de *P. americana*, *P. fuliginosa*, *B. orientalis*, *B. germanica* y *Blaptica dubia* Serville (Blattodea: Blaberidae). A través de las disecciones realizadas y utilizando las técnicas correspondientes a cada grupo, incluyendo medidas morfométricas y técnicas moleculares, se pudieron aislar e identificar varias especies de parásitos y patógenos.

Durante los estudios prospectivos tendientes a la detección de protistas asociados a cucarachas urbanas se describieron tres especies de gregarinas y un protista esporogénico. Las gregarinas identificadas fueron *Protomagalhaensia* sp. y *Blabericola* sp. (Eugregarinoidea: Blabericolidae) presentes en el intestino medio de *Blaptica dubia* y *Gregarina* sp. (Eugregarinoidea: Gregarinidae) detectada en la cucaracha marrón ahumada o *P. fuliginosa*. Fue detectado un eucariota unicelular esporogénico en los divertículos intestinales de la cucaracha oriental o *B. orientalis*.

Wolbachia sp. (Rickettsiales: Anaplasmataceae) fue identificada en *B. dubia* y *Panchlora nivea* (L.) (Blattodea: Blaberidae), mediante el uso de técnicas moleculares siendo este el primer registro de esta bacteria endosimbionte en las mencionadas especies de cucarachas. Se realizó la identificación morfológica morfométrica y molecular de dos nematodos parásitos *Leidynema appendiculata* (Leidy) Chitwood y *Hammerschmidtella* sp. Chitwood (Oxyurida: Thelastomatidae) presentes en *P. fuliginosa*.

Fueron identificadas especies de Laboulbeniales, *Herpomyces ectobiae* Thaxter en las antenas de *Blattella germanica*, *H. periplanetae* Thaxter en las antenas de *P. americana* y *H. stylopygae* Spegazzini en las antenas de *P. fuliginosa*. Asimismo se detectó la presencia de infecciones fúngicas naturales en cucarachas silvestres. A partir de estos insectos fue posible aislar e identificar una especie de *Metarhizium anisopliae* sl. (Metchnikoff) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) con tres aislamientos, dos encontrados en Entre Ríos y el tercero en Buenos Aires. De los aislamientos anteriores fue evaluada su patogenicidad bajo condiciones controladas de laboratorio, determinándose que los tres aislamientos eran patogénicos para ninfas de *B. germanica*. Por otro lado, se realizó una selección de especies de hongos entomopatógenos a partir de los aislamientos preservados en la colección del CEPAVE. Los ensayos realizados demostraron que los aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin CEP077 y *M. anisopliae* CEP085 fueron los más patogénicos para ninfas y adultos de *B. germánica* por contacto directo en comparación con el cebo. Se determinó la dosis letal media (DL₅₀) y el tiempo letal medio (TL₅₀) a través de aplicación tópica con *M. anisopliae* de cuatro especies de cucarachas. Fue posible obtener la DL₅₀ y TL₅₀ de ninfas y adultos de *B. germánica* y *B. dubia*, de ninfas de *B. orientalis* y *P. americana*, habiéndose observado una susceptibilidad

diferencial entre las diferentes etapas de desarrollo y entre especies. Debido a los resultados obtenidos de los ensayos de laboratorio realizados con hongos entomopatógenos se determinó la composición de ácidos grasos epicuticulares de cinco especies de cucarachas (*P. americana*, *P. fuliginosa*, *B. orientali*, *B. germánica* y *B. dubia*). Las cucarachas analizadas presentaron un perfil de ácidos grasos diferentes tanto entre especies como entre distintas etapas de desarrollo. Estos resultados contribuirán a estudios futuros para poder determinar el papel que cumplen los lípidos y ceras superficiales en la patogénesis fúngica. Finalmente, se evaluó la producción de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en sustrato arroz parbolizado y se comprobó que la suspensión de conidios obtenida luego de la producción mantuvo las características de germinación y viabilidad de los aislamientos originales, si bien el arroz con el hongo no funcionó como cebo, se podría llegar a inferir que sería factible producir estos hongos en mayor escala para futuras aplicaciones a campo.

Tomando como base los resultados previamente expuestos, se puede concluir que existen en la naturaleza y en el entorno urbano, patógenos que podrían ser utilizados en programas de MIP de cucarachas, con especial atención a los hongos entomopatógenos.

ABSTRACT

Cockroaches show a worldwide distribution. There are approximately 4000 described species, but only 1% of the known species are considered pest for mankind. House cockroaches, and those who live around, can survive in relation to any human settlement that provide heat, humidity, and nourishment. In Argentina, there are 90 described species. German cockroach, *Blattella germanica* (Linnaeus); American cockroach, *Periplaneta americana* (Linnaeus); Smokybrown cockroach, *P. fuliginosa* (Serville); Oriental cockroach, *Blatta orientalis* (Linnaeus) as considered pests. Cockroaches have a significant economic and medical impact. By contaminating food and other raw material. Furthermore, they can act as mechanical vectors of different pathogens and contribute to increase allergic processes. They are considered asthma exacerbation and induction agents, mainly through their faeces and moults.

The cost of the cockroache control can be a heavy burden throughout time and the pesticides use can cause a problem in human health. Over the years, the control was focused on the systematic and precautionary use of chemical pesticides, and many

studies have shown that cockroaches are capable of developing resistance to most of the pesticides on a large scale. Due to the capacity of designing efficient methodologies in the cockroaches control, in which pathogens will be incorporated, the amount of neurotoxic pesticides used will be reduced and acceptable levels of control throughout time will be achieved. The goal of this study was to develop strategies that were compatible with the environment and capable of reducing the density of cockroaches in urban spaces through the use of pathogens.

Firstly, in order to find pathogens, a cockroaches research was carried out. Several species of cockroaches were collected and a rearing was kept at CEPAVE laboratory. Through dissections and established techniques for each group, including morphometric measurements and molecular techniques, several species of parasites and pathogens were isolated.

As a result of prospective studies in order to detect protists associated to urban cockroaches, there were identified three species of Gregarines and one species of protist sporogenic. The species of gregarines were *Protomagalhaensia* sp. and *Blabericola* sp. (Eugregarinoidea: Blabericolidae) located in the middle gut of *Blaptica dubia* and *Gregarina* sp. (Eugregarinoidea: Gregarinidae) in the Smokybrown cockroach *P. fuliginosa*. It was also recorded a one unicellular sporogenic eukariot in the gut diverticles of *Blatta orientalis*.

Wolbachia sp. (Rickettsiales: Anaplasmataceae) was recorded in *B. dubia* and *Panchlora nivea* (L.) (Blattodea: Blaberidae) through the use of molecular techniques. Being this the first report of this genus in the referred species of cockroaches. Moreover there were identified two species of parasitic Nematodes: *Leidynema appendiculata* (Leidy) Chitwood and *Hammerschmidtella* Chitwood (Oxyurida: Thelastomatidae) by morphological, morphometrical and molecular characterization in *P. fuliginosa*.

Laboulbeniales fungi were identified from *Blatella germanica*, *Herpomyces ectobiae* Thaxter in *B. germanica*, *H. periplanetae* Thaxter in *P. americana* and *H. stylopygae* Spegazzini in *P. fuliginosa*, all of them located in the antennae of their hosts.

The presence of fungal infections detected in wild cockroaches. Three *Metarhizium anisopliae* sl. (Metchnikoff) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) strains were isolated and identified. Their pathogenicity was evaluated under laboratory

controlled conditions. There was determined that all the isolates were pathogenic for nymphs of *B. germanica*. On the other hand, a selection of entomopathogenic fungi was made from the preserved isolates at the CEPAVE collection, and the tests showed that the *B. bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin CEP077 and *M. anisopliae* CEP085 isolates were the most pathogenic for *B. germanica* nymphs and adults compared by direct contact with bait. Was possible to estimate the susceptibility of nymphs of *B. orientalis*, *P. americana* and nymphs and adults of *B. germanica* and *B. dubia* to the fungus *M. anisopliae* CEP085 through median lethal doses (LD₅₀) and Median Lethal Time (LT₅₀). The adults of *B. orientalis* were not susceptible to this isolate of entomopathogenic fungus. The composition of cuticle fatty acids of five species was determined and all the analyzed cockroaches showed different fatty acids between species and among different developmental stages. In the future, these studies will help to determine the role the lipids and superficial wax in the fungal pathogenesis. Finally, the production of the *B. bassiana* and *M. anisopliae* isolates was evaluated in parboiled rice, and it was shown that the conidial suspension obtained after the production had the same germination and viability characteristics as the original isolates. Even though the rice with the fungi did not work as bait, it would be assumed that it is possible to produce these fungi on a large scale in future field application.

In view of the results previously exposed, it may be concluded that there exist pathogens in nature that could be used to control cockroaches IPM programmes, with particular emphasis on entomopathogenic fungi.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las cucarachas presentan una distribución mundial, hay descritas aproximadamente 4000 especies, sin embargo solo el 1% de las especies de cucarachas conocidas son consideradas plaga para el hombre. Las cucarachas domiciliarias y peridomiciliarias sobreviven bien en asociación con cualquier asentamiento humano que proporcione calor, humedad y alimento, tales como departamentos, casas, hospitales e instalaciones de manipulación de alimentos (Cochran, 2003).

En Argentina hay descritas 90 especies de cucarachas y las consideradas plaga para el hombre son la cucaracha alemana, *Blattella germanica* (Linnaeus); cucaracha americana, *Periplaneta americana* (Linnaeus); cucaracha marrón ahumada, *Periplaneta fuliginosa* (Serville); cucaracha oriental, *Blatta orientalis* (Linnaeus), estas dos últimas especies son más comunes en las regiones de clima templado (Mariconi, 1999; Appel & Smith, 2002); la cucaracha marrón o *Periplaneta brunnea* (Burmeister), de aparición esporádica en la República Argentina (Crespo & Valverde, 2008). Dentro de estas, la cucaracha alemana es la que causa la mayor preocupación y perjuicios en zonas urbanas. Las cucarachas emiten un olor característico debido a las feromonas que producen (agregación, defensa o reproductivas) y si las infestaciones son grandes, el olor es fuerte, desagradable e impregnan toda la habitación.

Las cucarachas tienen un impacto económico y médico significativo y contaminan los alimentos y otras materias primas. El costo para el control de las cucarachas puede convertirse en una carga significativa en el tiempo, y el uso de plaguicidas para el control de cucarachas puede ser un problema de salud grave para niños pequeños (Wang & Bennet, 2010). Las cucarachas pueden actuar como vectores mecánicos de patógenos en domicilios, hospitales, restaurantes etc., y pueden trasladar los agentes patógenos en su tracto digestivo, en el tegumento, en las espinas de sus patas y excrementos. La contaminación con patógenos pueden ocurrir por la regurgitación del alimento, por contacto directo o por deposición de heces en lugares habitados por los seres humanos (Ramírez Pérez, 1989). En los hogares pueden contribuir a aumentar los procesos alérgicos, ya que son agentes de inducción y exacerbación del asma (Mindykowski *et al.*, 2010). Algunos ejemplos de patógenos transportados por cucarachas son hongos, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., y *Candida* spp., *Geotrichum*

spp. (Lemos *et al.*, 2006), y bacterias como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* (Pai *et al.*, 2005). Las cucarachas son causantes de diferentes niveles de estrés en las personas, que se ven exacerbados en las personas que sufren entomofobia (Milner & Pereira, 2007).

En la Argentina un denominador común que dificulta el control de las cucarachas es la falta de métodos eficientes y seguros que disminuyan la densidad de estos insectos a mediano y largo plazo y que sean compatibles con el ambiente. El control químico con insecticidas neurotóxicos está actualmente limitado a nivel mundial por el rápido desarrollo de resistencia en los insectos, la cual ha sido demostrada en un amplio rango de insecticidas que incluyen organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides, y ésta se traduce en una disminución de la efectividad del producto que lleva a que ocurran fallas de control a campo (Lin *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004).

La regulación del número de insectos mediante la acción de los enemigos naturales, depredadores, parásitos y patógenos, conocido como control biológico, tiene lugar en la naturaleza en forma continua, efectiva aunque no suficiente, y sin requerir la intervención del hombre. Las cucarachas urbanas tienen un bajo número de enemigos naturales conocidos, que los potencian como candidatos para ser utilizados como agentes de control biológico de estos insectos e integrarlos en programas de manejo integrado de vectores. El hecho de poder diseñar metodologías eficientes de control de cucarachas en las cuales se incorporen patógenos permitirá reducir las cantidades de insecticidas neurotóxicos utilizados y lograr aceptables niveles de control, persistentes en el tiempo. Los registros en la Argentina sobre parásitos y patógenos de cucarachas son escasos y fragmentarios y no registran citas de hongos entomopatógenos en cucarachas (Lange, 1991, 1993; Camino *et al.*, 2008, 2012; Blanco *et al.*, 2012).

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES Y MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES



ANTECEDENTES

Biología y comportamiento de las principales cucarachas plagas en la República Argentina.

El Orden Blattodea Brunner, incluye a las cucarachas, y se definen como un grupo monofilético frente a mantidos y termitas por: 1, cabeza opistognata; 2, deposición de la ooteca con posterioridad a su esclerotización; 3, sección transversal de los paraproctos en forma de “V”; 4, proventrículo de simetría bilateral; 5, Tergos VIII y IX acortados (Grandolas, 1996). Las cucarachas son insectos de tamaño mediano a grande, con el cuerpo achatado dorsoventralmente. Antenas filiformes multiartejadas. Aparato bucal masticador. Ojos compuestos bien desarrollados y ocelos laterales presentes. El primer segmento torácico presenta un escudo dorsal, el pronoto, que cubre parte de la cabeza. Alas anteriores semicoriáceas, denominadas tegminas, protegen al segundo par de alas membranosas. Patas corredoras similares entre sí, que les permiten desplazarse a gran velocidad y por espacios estrechos. El abdomen consta de once segmentos aunque el último es inconspicuo. En la región posterior del abdomen los machos llevan un par de estilos, que son importantes durante la cópula, los estilos permiten diferenciar a los machos de las hembras. Los cercos se encuentran en ambos sexos y tienen uno a varios segmentos; poseen mecano receptores para detectar las vibraciones ambientales (Crespo & Valverde 2005; Cochran, 1999). La coloración de las cucarachas, asociadas a ambientes urbanos, oscila entre un color marrón rojizo a marrón oscuro y del negro rojizo al negro. Las cucarachas tienen una metamorfosis incompleta, con tres etapas de vida: huevo, ninfa y adulto (Cochran, 2003). Los huevos de las cucarachas son depositados en grupos en una cápsula llamada ooteca, la región superior es dentada y se llama quilla, lugar donde se escinde permitiendo la salida de los juveniles. Esta cápsula cae luego de su formación o es pegada por la hembra a una superficie tan pronto como se forma. Sin embargo, la hembra de la cucaracha alemana lleva la cápsula que sobresale de su cuerpo hasta que los huevos están listos para eclosionar (Koehler *et al.*, 2013). La etapa de ninfa comienza con la eclosión de los huevos y termina con la emergencia del adulto. Las ninfas no poseen alas. El número de mudas requerida para alcanzar la fase adulta varía, depende de la especie. Las cucarachas presentan un fototactismo negativo, es decir tienden a alejarse de la luz y se

esconden en lugares húmedos y oscuros, en enredaderas presentes en los jardines, árboles huecos, pilas de madera y mantillo. Las cucarachas son omnívoras y alimentadores oportunistas consumen casi cualquier tipo de sustrato, materia orgánica en descomposición, dulces, papel, cuero, pan, cereales, fruta, libros, otros insectos (Cochran, 2003).

En la Argentina, como en el resto del mundo, algunas especies de cucarachas son una plaga. En cuanto a su frecuencia en las casas el orden de importancia es: *B. germanica*, *P. americana*, *P. brunnea*, *P. fuliginosa* y *B. orientalis*. *Supella longipalpa* (Fabricius) (Blattodea: Blattellidae) sería ocasional y faltaría *P. australasiae* (Fabricius) (Blattodea: Blattidae). Aparentemente no todas las regiones del planeta son colonizadas por las mismas especies que son consideradas cosmopolitas. Según lo sugiere la bibliografía, solo cinco de las siete especies domiciliarias se encuentran presentes en Argentina (Crespo & Vaverde, 2008).

Familia Blattellidae

-*Blattella germanica* (Linnaeus), cucaracha rubia o alemana.

La cucaracha alemana se encuentra en todo el mundo en asociación con los seres humanos, son domiciliarias, su ciclo de vida es relativamente corto y su alta fecundidad permite que rápidamente se conviertan en un problema en el hogar. Estos insectos invaden cocinas, baños de casas, departamentos, restaurantes, hospitales y cualquier estructura realizada por el hombre que le pueda proveer de alimento, agua y refugio. El adulto mide 10-15 mm de largo, de color marrón claro a castaño con dos bandas negras longitudinales que corren a lo largo del pronoto. Los machos tienen un cuerpo delgado, el abdomen es cónico, amarillo, los segmentos terminales del abdomen son visibles no cubiertos por tegminas. Las hembras son de color castaño, pero más oscuras que el macho, las hembras tienen el abdomen más ancho, redondeado posteriormente y las alas anteriores cubren todo el abdomen (Valles S., 2014; Koehler & Castner, 2012). La hembra adulta, lleva la ooteca durante unas tres semanas, hasta la eclosión de las ninfas. El número de mudas más frecuente reportado para esta especie es de seis y a temperatura ambiente el desarrollo de ninfa a adulto se completa en 60 días. El ciclo de vida completo de huevo a adulto por lo general toma alrededor de tres meses (Koehler & Castner., 2012). La ninfa uno, mide 3 mm de largo es de color negro con una banda marrón claro en el segundo y tercer segmento torácicos. En estadios posteriores, la

banda se hace más estrecha. La ninfa de tercer estadio mide 6 mm de largo y es de color marrón oscuro a negro, con una banda más clara que se extiende desde el pronoto por detrás de la cabeza hasta el abdomen. El sexto estadio de ninfa mide 10 mm de largo y es negro, excepto por los bordes del tórax que son claros y la banda clara se redujo a una línea estrecha en la región media del tórax. El abdomen es en su mayoría completamente negro (Cochran, 1999).

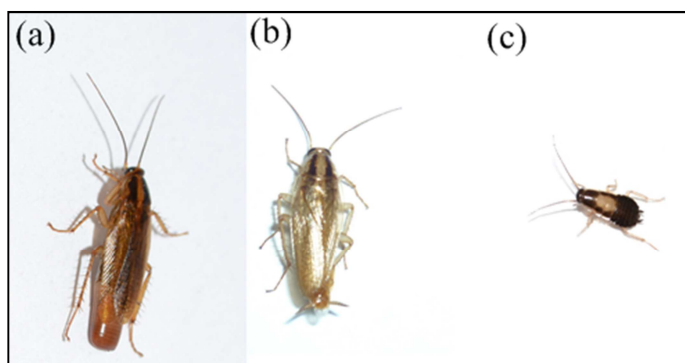


Figura 1. *B. germanica*, (a) hembra, (b) macho, (c) ninfa III.

Familia Blattidae

-*Periplaneta fuliginosa* (Serville), cucaracha café ahumada

Esta cucaracha está estrechamente relacionada con la cucaracha americana y se ha convertido en una plaga importante en muchas partes del mundo (Suiter & Koehler, 2003c); prospera en climas cálidos y húmedos; es principalmente una especie subtropical que es sensible a la desecación, son peridomiciliarias pero frecuentemente invaden las casas (Appel & Smith, 2002). Estas especies han sido citadas en Asia, Europa, Australia, América del Norte y Sur, mientras que en la Argentina, fueron citadas para Capital Federal y los alrededores de Buenos Aires, Pergamino y Tucumán (Crespo & Valverde, 2008). *Periplaneta fuliginosa* es una especie de gran tamaño, de color caoba a marrón oscuro brillante, un pronoto sin patrón; los adultos miden 25 a 38 mm de largo y son macropteros (Appel & Smith, 2002). Las ninfas del primer estadio son fáciles de identificar, el cuerpo es negro brillante, con bandas blancas en las antenas, el mesotórax y en los márgenes de los dos primeros segmentos abdominales (Peggy *et al.*, 1980). Es común observar en el primer y segundo estadio, la parte posterior del abdomen hacia arriba, similar a las tijeretas o escarabajos estafilínidos. Los siguientes estadios de ninfa son de color castaño, pero mantienen algún patrón de color de los primeros estadios, como bandas o manchas de color amarillo o naranja (Appel &

Smith, 2002). Los últimos estadios son indistinguibles de las ninfas de *P. americana*; Gordon (1992) proporciona una clave que separa las ninfas de ambas especies. El ciclo de vida de *P. fuliginosa* requiere alrededor de 320 días para completar el desarrollo, sin embargo puede duplicarse a temperaturas menores de 15 °C (Tsuji, 1975). La hembra lleva la ooteca durante 24 horas y la deja caer o la pega en alguna superficie, la ooteca mide de 11 a 14 mm de largo y es de color marrón oscuro, el tiempo de incubación en promedio es de 45 días. De cada ooteca pueden eclosionar hasta 20 ninfas y los adultos viven de 2 a 6 meses (Suiter & Koehler, 2003c). Presentan un número variable de estadios ninfales que varían para las hembras de 10 a 12 y de 9 a 11 para los machos (Appel & Smith, 2002). Las poblaciones de *P. fuliginosa* son muy activas y móviles, tienen un movimiento continuo hacia el interior del hogar. Sus escondites se encuentran próximos a las casas, por ejemplo arbustos, árboles, pilares de madera, sótanos, techos, áticos, garajes, invernaderos, alcantarillas (Suiter & Koehler, 2003c). El control de estos insectos en el interior de la casa no es efectivo sino se trata el exterior (Smith *et al.*, 1995).

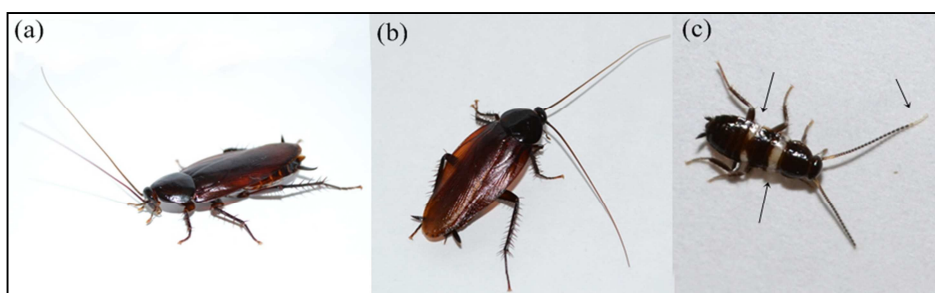


Figura 2. *P. fuliginosa*, (a) hembra, (b) macho (c) ninfa I con las características bandas blancas.

-Periplaneta americana (Linnaeus), cucaracha americana

Son las cucarachas más grandes que infestan las casas, los adultos de ambos sexos presentan aproximadamente el mismo tamaño, pueden medir 3,5 a 4 cm de largo, la hembra tiene un abdomen más robusto que el macho. Ambos sexos presentan alas, sin embargo prefieren correr cuando se las perturba. Las antenas son tan largas como el cuerpo (Cochran, 1999). Los adultos son de color rojizo, y alrededor del borde del pronoto presentan una banda amarilla (Barbara, 2005).

El ciclo de vida de la cucaracha americana es extremadamente variable y depende de las variaciones en las diferentes condiciones de cría, especialmente la dieta,

la temperatura, y el grado de aglomeración. Después de convertirse en adulto, la hembra de la cucaracha americana se aparea y producirá una ooteca dentro de los 3 a 7 días. La hembra lleva la ooteca durante 24 horas para luego pegarla en una superficie dura con secreciones de la boca o la deja caer cerca de una zona donde haya alimento y humedad (Perrot, 2010). El período de incubación es de 30 a 45 días, con extremos de 24 a 100 días (Cornwell, 1968). La ooteca puede contener de 14 a 16 huevos; sin embargo, el número promedio de ninfas es de 13,6. Las ninfas mudan de 7 a 13 veces en el transcurso de 5 a 15 meses. Las primeras mudas tienden a ocurrir a intervalos regulares, mientras que los estadios posteriores mudan a intervalos variables. Bajo condiciones adversas las ninfas pueden entrar en un período de diapausa y cesar su crecimiento prolongando considerablemente el período de ninfa (Nigam, 1933; Cochran, 1999). Una hembra puede producir de 30 a 90 ootecas a intervalos de aproximadamente 4 a 7 días a lo largo de su vida (Suiter & Koehler, 2003a). Las hembras adultas pueden llegar a vivir 2 años. El primer estadio de ninfa es de color grisáceo y después de las primeras mudas se vuelven de color rojizo (Jacobs, 2013). Son especies que en general viven en el exterior de las casas, sin embargo, las poblaciones también pueden moverse hacia el interior y vivir en estructuras humanas cuando las condiciones de alimento, refugio, temperatura y humedad son apropiadas (20 -30 °C), también pueden vivir en tuberías de agua, baños, lavaderos y en las cloacas (Bell & Adiyodi 1981; Perrot, 2010).

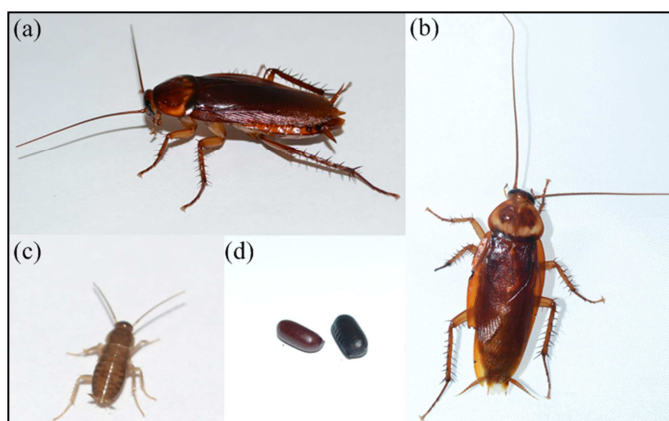


Figura 3. *P. americana*, (a) hembra, (b) macho, (c) ninfa I, (d) ootecas.

-Blatta orientalis Linnaeus, cucaracha oriental

El adulto mide en promedio 2,5 cm de largo, es de color negro. El macho tiene alas completamente desarrolladas que no sobrepasan los 2/3 del abdomen, no vuelan. La hembra tiene alas rudimentarias que se reducen a lóbulos y su cuerpo es ancho en

comparación con el macho (Suiter & Koehler, 2003b). Si las condiciones de temperatura y alimento son óptimas, en 6 meses pueden completar el ciclo de vida, pero bajo condiciones desfavorables puede requerir más de 2 años (Cornwell, 1968). Luego del apareamiento las hembras forman una ooteca que contiene en promedio 16 huevos, que puede cargar de 12 horas hasta 5 días, para luego depositarla en un lugar protegido cerca de una fuente de alimento y humedad (McCanless, 2011). El período de incubación es de 42 a 81 días, pero bajo temperaturas invernales la ooteca puede entrar en un estado de dormancia hasta que las condiciones sean favorables (Cornwell, 1968). Las ninfas mudan entre 7 y 10 veces durante 130 a 165 días para los machos y 280 a 300 días para las hembras (Willis *et al.*, 1958). Los adultos pueden vivir de 35 a 180 días o más (Cornwell, 1968). Esta especie ha presentado en algunos casos partenogénesis (Roth & Willis, 1956). La cucaracha oriental puede alimentarse de una gran variedad de cosas, pero prefieren los alimentos ricos en almidón (Suiter & Koehler, 2003b). Colonizan las tuberías con goteras, drenajes de pisos y cloacas. Su habilidad para resistir inmersiones temporarias le permite atravesar el agua retenida en los sifones de drenaje. En la Argentina actualmente no son abundantes, pero lo fueron tal como lo demuestran los registros y colecciones que van de principio a mediados del siglo XX, por lo menos para Buenos Aires y alrededores. Según los datos obtenidos se confirma su preferencia por las zonas templadas (Crespo, & Valverde, 2008).

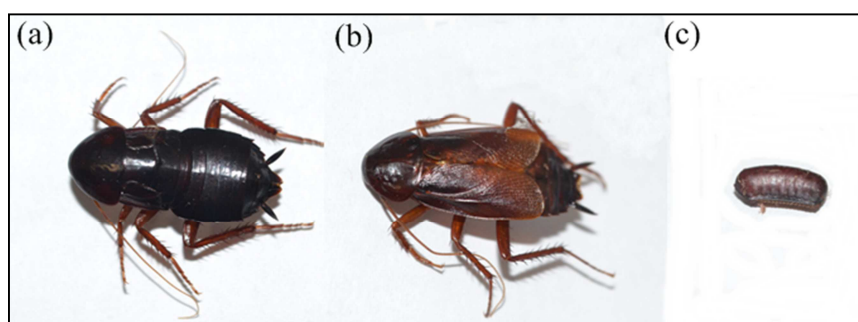


Figura 4. *B. orientalis*, (a) hembra, (b) macho, (c) ooteca.

Familia Blaberidae

-*Blaptica dubia* Serville, cucaracha argentina

Son de tamaño medio a grande, miden en promedio 4,5 cm de longitud. El adulto es de color marrón a negro con manchas amarillas o anaranjadas en el tórax y abdomen. Presentan dimorfismo sexual, los machos tienen alas, pero raramente vuelan,

las hembras tienen alas rudimentarias. Los adultos y las ninfas no pueden escalar superficies lisas ya que carecen de arolium entre sus garras. Es una especie ovovivípara, es decir, da a luz a crías vivas. Este patrón de reproducción es característico de la familia Blaberidae, hacen girar y reintroducen las ootecas en un saco de incubación (Grandolas, 1999). Presentan siete estadios ninfales (Wu H. *et al.*, 2013). Se distribuyen en América Central y América del Sur. Esta especie es utilizada como fuente de alimento en la cría de arañas, reptiles y anfibios. Es una especie peridomiciliaria, es una molestia ocasional para el hombre, se encuentra generalmente en los techos de madera de las casas, en las leñeras de la parrillas y debajo de macetas en parques, jardines y cementerios (Crespo & Valverde, 2005).

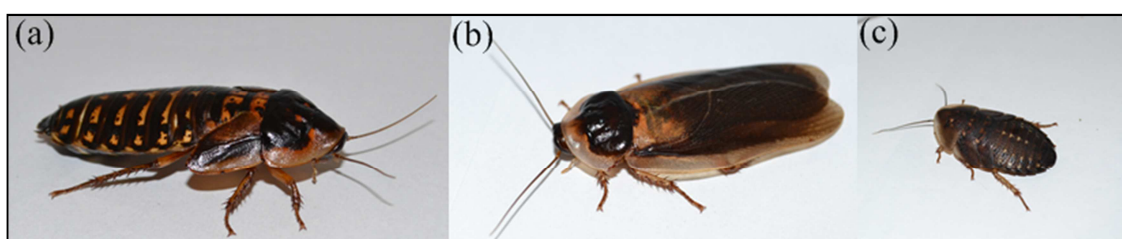


Figura 5. *B. dubia*, (a) hembra, (b) macho, (c) ninfa.

La cucaracha como vector mecánico, alergias y entomofobia

Las cucarachas son importantes vectores mecánicos de patógenos en domicilios, hospitales, restaurantes etc.; debido a su desplazamiento de una localidad a otra, por ejemplo en cloacas y en lugares donde se procesan alimentos, provee a los organismos infecciosos de un medio de transporte para la contaminación, pueden contener agentes patógenos en su tracto digestivo, en el tegumento, en las espinas de sus patas y excrementos. La transmisión rápida de enfermedades es favorecida por la capacidad de regurgitación del alimento por parte de estos insectos y además, las bacterias permanecen viables en el tracto digestivo por períodos prolongados, siendo entonces el contagio posible a través de las deyecciones (Ramírez Pérez, 1989). Algunos ejemplos de patógenos transportados por cucarachas son hongos, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Candida* spp. y *Geotrichum* spp. (Lemos *et al.*, 2006), y bacterias como la *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* (Pai *et al.*, 2005). En los hogares las cucarachas pueden contribuir a aumentar los procesos de alérgica, ya que son agentes de inducción y exacerbación del asma, debido a las mudas y las heces que generan (Nowak-Wegrzyn *et al.*, 2009; Mindykowski *et al.*, 2010). En los últimos años

se han realizado varios estudios centrado en la asociación entre el asma y la presencia de alérgenos de cucarachas y determinaron que incluso un número bajo de cucarachas pueden producir cantidades significativas de alérgenos (Wang *et al.*, 2008; McConnell *et al.*, 2005). Las cucarachas son causantes de diferentes niveles de estrés en las personas, que llegan a generar *reacciones* de terror y ansiedad en las personas que sufren entomofobia (Milner & Pereira, 2007).

Manejo de las poblaciones de cucarachas

Control químico

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias, de origen natural o sintético u organismo vivo, destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga de los cultivos, productos agrícolas o que son vectores de las enfermedades del hombre. Igualmente cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se las use como defoliantes, desecantes, reguladores de crecimiento, y las que se aplican a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto. El ingrediente activo se define como cualquier sustancia química o de origen biológico capaz de actuar como plaguicida. (FAO/WHO, 2010). Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su función. Por ejemplo según su función: en insecticidas los que controlan insectos; en herbicidas los que controlan las malezas; y fungicidas los que controlan hongos y mohos. La Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica los plaguicidas en base a su toxicidad aguda en estudios con animales, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto. Esta clasificación considera 5 categorías (Tabla 1). Los insecticidas, pueden producir daños importantes a las plantas, a insectos benéficos, no controlar las plagas y poner en riesgo la salud, además de contribuir a la contaminación del suelo, aire y agua, por eso es de gran importancia seguir correctamente las instrucciones de la etiqueta. Antes de aplicar un insecticida el usuario debería aprender los riesgos, como utilizarlo correctamente y cómo eliminar correctamente los envases vacíos (Wilen *et al.*, 2008). En la Argentina la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) registra los productos plaguicidas de uso doméstico o domisanitarios formulados de venta libre, de venta profesional y de uso exclusivo en Salud Pública para control de

vectores de enfermedades transmisibles al ser humano, estos incluyen la mayoría de los insecticidas utilizados en el hogar para el control de cucarachas. La institución ANMAT, define a los productos domisanitarios como aquellas sustancias o preparaciones destinadas a la limpieza, lavado, odorización, desodorización, higienización, desinfección o desinfestación, para su utilización en el hogar, y/o ambientes colectivos públicos y/o privados.

Tabla 1. La Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica los plaguicidas en base a su toxicidad en cuatro categorías.

Clasificación de la OMS según los riesgos	Clasificación del Peligro
I a - Producto Sumamente Peligroso	Muy Tóxico
I b - Producto Muy Peligroso	Tóxico
II - Producto Moderadamente Peligroso	Nocivo
III- Producto Poco Peligroso	Cuidado
IV - Producto que Normalmente no Ofrecen Peligro	Cuidado

Los datos muestran que en la Argentina el uso de plaguicidas domésticos en las ciudades ha sido poco estudiado, a nivel de sus riesgos e impactos en la salud. No se conoce la magnitud del uso, los niveles de exposición de las familias, el sistema de comercialización y los aspectos normativos para el uso de estas sustancias tóxicas en los hogares (Ministerio de Salud de la Nación, 2006). Los estudios encontraron un alto nivel de proliferación de plaguicidas en las cadenas de supermercados, que se comercializan sin las especificaciones normativas y muchas veces muy cerca de productos alimenticios. Se hace entonces evidente que la población general desconoce la magnitud de los riesgos a los que originariamente se expone y la existencia de distintos grados de peligrosidad en los productos disponibles en el mercado. El conocimiento por parte de la población resulta un factor indispensable para lograr minimizar esta problemática, ya que la utilización de estos plaguicidas domésticos expone a la población a graves riesgos de intoxicación y a efectos deletéreos, aun desde la niñez y la estancia en el vientre materno (Ministerio de Salud de la Nación, 2006).

En el mercado, según datos de ANMAT de noviembre de 2014 para uso domisanitario, hay 170 productos aprobados como insecticidas para el control de cucarachas. Predominando tres formulaciones, los concentrados emulsionables (CE)

(28,8 %); los aerosoles (25,9 %) y los cebos (21,8 %). Dentro de los CE los ingredientes activos en su mayoría son piretroides, o una combinación de piretroides con otros insecticidas. Algunos formulados contienen insecticidas que funcionan como reguladores del crecimiento como flufenoxurón, piriproxifen, otros contienen fipronil (fenilpirazoles), y por último, si bien su uso es poco recomendado, aún existen productos que contienen carbamato (propoxur) y organofosforado (metil pirimifós). Los aerosoles contra cucarachas contienen como ingredientes activos en todo los casos un piretroide (cipermetrina, deltametrina, permetrina, praletrina etc.), o se formula al piretroide en conjunto con piriproxifen o butóxido de piperonilo como sinergista (Fig.6). Por último los cebos, contienen como ingredientes activos imidacloprid, hidrametilnona, sulfluramida, indoxacarb o fipronil (Fig. 7). Solo existe un producto en el mercado considerado de bajo riesgo que contiene ácido bórico y tierra de diatomeas y se encuentra formulado como un polvo para usar en seco. La mayoría de los insecticidas utilizados en el control de cucarachas están clasificados por la OMS como de clase II o nocivos; excepto la hidrametilnona y sulfluramida que están clasificados de clase III, ligeramente peligroso (OMS), esto significa que no ofrecen peligro bajo uso normal.

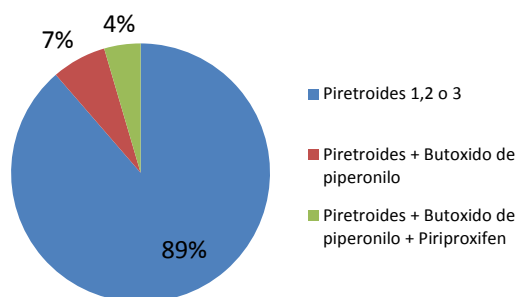


Figura 6. Porcentaje de ingredientes activos formulados como aerosoles para el control de cucarachas.

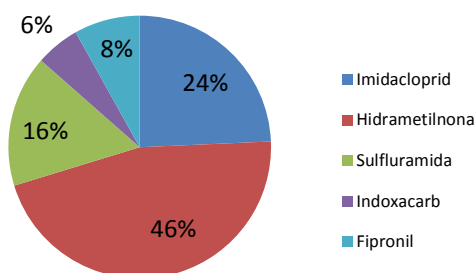


Figura 7. Porcentaje de ingredientes activos formulados como cebos para el control de cucarachas.

El mercado de los insecticidas en Argentina no ofrece muchas opciones para aplicar formulados dentro de estrategias de un control de bajo riesgo. Es importante que tengamos un amplio espectro de formulaciones de insecticidas de bajo impacto ambiental para aplicar en el hogar. La mayoría de los insecticidas que se encuentran a disposición del público en general son líquidos, aerosoles y geles que contienen ingredientes activos principalmente de la familia de los piretroides. Si bien hay un interés por parte de la población por utilizar productos menos tóxicos, aún continúa la aplicación sistemática de insecticidas orgánicos con las consecuencias que puede traer para la población y el ambiente.

Resistencia a los insecticidas: problemática a nivel mundial y en Argentina

Los datos históricos han demostrado que las cucarachas tienen la capacidad para desarrollar resistencia a la mayoría de los insecticidas en uso a gran escala (Cochran 1995, 1999; Scharf & Bennett 1995). El insecticida actúa como una fuerza selectiva que concentra en la población individuos resistentes (Cochran, 1989). Los genes que confieren resistencia existen en el genoma de la población como un carácter pre-adaptativo y la capacidad de desarrollo de resistencia depende de la variabilidad genética de la especie. Se han detectado poblaciones de cucarachas resistentes a los carbamatos, organofosforados y piretroides. En los últimos años se han detectado poblaciones de cucarachas resistentes al diclorvos y al propoxur (Qian *et al.*, 2010), y en Estados Unidos y Europa al fipronil (Holbrook *et al.*, 2003; Kristensen *et al.*, 2005). Existe una resistencia del comportamiento detectada en poblaciones de *B. germanica*, fue reportada por Ross (1993, 1998), Silverman y Bieman (1993), y Silverman y Ross (1994). La aversión a la glucosa causó el fracaso de un producto de cebo de cucarachas en la década de 1990 (Silverman & Bieman 1993). Wang *et al.*, 2004 demostraron que existe en poblaciones a campo, resistencia de comportamiento en respuesta a ingredientes inertes del gel después de la exposición repetida, y observaron una aversión a los cebos en gel que contenían azúcar. Es interesante recalcar que las poblaciones de cucarachas pueden tener un cambio de comportamiento y producir la aversión de un cebo tanto del ingrediente activo del insecticida como de ingredientes inertes. En 2001

fue detectada resistencia a insecticidas organofosforados y piretroides en poblaciones de *B. germanica* presentes en la provincia de Buenos Aires (Taiariol *et al.*, 2001). En Argentina falta realizar más estudios para determinar la resistencia que existe en las diferentes especies de cucarachas a nivel poblacional.

Control cultural y planes de manejo integrado de plagas (MIP)

En los entornos urbanos las cucarachas sinantrópicas se desvincularían de la mayoría sus enemigos naturales conocidos. Por lo tanto las poblaciones estarían reguladas principalmente por factores abióticos y factores relacionados con la densidad de la población, más que por gremios de parasitoides y patógenos co-evolucionados como ocurre en la naturaleza (Schal & Hamilton, 1990). Debido a esto las infestaciones de cucarachas en los hogares, hospitales, restaurantes etc. pueden llegar a miles de individuos. A lo largo de los años el control se centró en el uso sistemático y preventivo de insecticidas químicos. Actualmente cuando se habla del control químico de cucarachas a nivel mundial, se debe detallar la importancia del control cultural antes de la aplicación de un insecticida, es decir, modificar el hábitat de la cucaracha, eliminando refugios potenciales o actuales y fuentes de alimento. Diversos estudios han demostrado que no hay un buen control a largo plazo cuando los insecticidas se usan como el único método de control en comparación a un plan de manejo integrado de plagas (Wang & Bennett, 2006, 2010). Actualmente no se piensa en la aplicación de insecticidas de forma regular y preventiva, sino que se busca un enfoque integrado a través del manejo integrado de plagas (MIP). El MIP es un enfoque que combina estrategias no químicas (por ejemplo, técnicas de exclusión, alteración de sitios de refugio y saneamiento adecuado) y la colocación selectiva de pesticidas con preferencia por los productos que son menos perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente. MIP consiste en la inspección de rutina y monitoreo, con la utilización del tratamiento químico sólo cuando las plagas están realmente presentes. El monitoreo continuo indica si las cucarachas están presentes y si las prácticas de control están funcionando (Jones, 2008). Los primeros en probar el MIP en Estados Unidos para el control de cucarachas fueron Smith *et al.* (1995) compararon dos tratamientos y evaluaron las diferencias entre el MIP y la aplicación tradicional del insecticida en el perímetro del hogar. El control de la cucaracha *P. fuliginosa* basa casi en su totalidad en la aplicación de un insecticida en aerosol alrededor del hogar de un perímetro de aproximadamente de 3 metros, que se realiza en algunos casos mensualmente (Appel & Smith, 2002). El MIP realizado en el

trabajo de Smith *et al.* (1995) consistió en la limpieza del paisaje para alterar los sitios de refugio y la aplicación selectiva de insecticidas en cebos y en aerosoles. Los resultados de este trabajo demostraron que con el MIP se redujo la abundancia de la cucaracha más rápido y durante un tiempo mayor en comparación con la pulverización convencional, además se utilizó un 80% menos del ingrediente activo del insecticida. Otro dato interesante fue que no hubo diferencia en la cantidad de tiempo dedicado a la aplicación de insecticidas entre el MIP y la pulverización convencional del perímetro. Dado que los métodos de MIP para el control *P. fuliginosa* tuvieron un mayor impacto en las cucarachas fuera de la zona perimetral, que las tratadas por el insecticida, el regreso de las cucarachas a esta zona y la invasión del interior del hogar se hizo más lenta (Smith *et al.*, 1997). Wang y Bennet (2009) realizaron un trabajo para monitorear las infestaciones y la presencia de alérgenos de *B. germanica* en complejo de departamentos de bajos ingresos, comparando el MIP con la aplicación de insecticidas químicos realizada por un contratista, incluyendo los costos de ambas aplicaciones. Demostraron que el MIP fue eficaz reduciendo la infestación por *B. germanica* y la reducción de alérgenos de las cucarachas presentes en los departamentos. Junto con la reducción del número de infestaciones, disminuyó el costo y el uso de insecticidas químicos, esto indica un ahorro a largo plazo al implementar el MIP sumado a los beneficios ambientales debido a la reducción del uso de plaguicidas. El aspecto negativo que se observó fue la falta de cooperación de los residentes. En la Argentina el enfoque integrado de plagas aplicado al control de las cucarachas aún presenta poca aplicación a campo.

Control biológico

El control biológico incluye el estudio, la importación, el aumento y la conservación de los enemigos naturales con el fin de regular la densidad de las poblaciones de plagas (Schal & Hamilton, 1990). Como enemigos naturales se destacan los depredadores, parasitoides y los entomopatógenos (Van Lenteren, 2000). Los organismos entomopatógenos usados como agentes de control biológico incluyen bacterias, virus, hongos, protistas y nematodos. Son numerosos los beneficios en los ecosistemas manejados por control biológico como el aumento de la actividad de otros enemigos naturales como parasitoides y depredadores, el aumento de la biodiversidad, la reducción de los residuos de plaguicidas en los alimentos que ocasionan beneficios a

la salud humana, el medio ambiente y a los organismos no blanco. Muchos entomopatógenos son específicos de ciertas especies o grupos de plagas de insectos y algunos tienen el potencial de proporcionar control a largo plazo. También hay algunas desventajas, en su mayoría vinculadas con su persistencia, el tiempo que tardan en generar la muerte del hospedador, la especificidad (el rango de hospedadores demasiado amplio o demasiado estrecho) y el costo relativamente alto en comparación con los insecticidas químicos convencionales (Lacey *et al.*, 2001). Es importante destacar que la patogenicidad de muchos de los patógenos descritos para cucarachas es desconocida y pocos han sido probados en el campo (Milner & Pereira, 2007; Suiter, 1997). Detallaremos algunos ejemplos de organismos aislados de cucarachas que pueden ser utilizados en el control biológico, y varios enemigos naturales no específicos, como por ejemplo el nematodo *Steinernema carpocapsae* y los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* que están siendo actualmente investigados para su uso como agentes de control biológico contra las cucarachas.

Parasitoides y depredadores

Las familias de himenópteros consideradas como enemigos naturales de las cucarachas incluyen a: Ampulicidae, Evaniidae, Encyrtidae, Eulophidae, Eupelmidae, y Pteromalidae (Roth & Willis, 1960). La mayoría de las especies son parasitoides de ootecas de cucarachas, pero las familias Ampulicidae y Sphecoidea, son depredadores de ninfas y adultos (Lebeck, 1991). Los Evaniidae, o avispas bandera, son parasitoides solitarios de ootecas (Townes, 1949). Son relativamente grandes, y con frecuencia se encuentran en las ventanas de las casas infestadas de cucarachas, a veces despertando más quejas que las cucarachas (Edmunfls, 1953). Los parasitoides principalmente parasitan las ootecas de cucarachas peridomiciliarias, como *P. americana*, *P. brunnea*, *P. fuliginosa*, *B. orientalis*, y *Supela longipalpa*. La estrategia reproductiva de las cucarachas alemanas las ha excluido del ataque de los parásitos de ootecas (Suiter, 1997). Las especies *Comperia merceti* (Compere) (Hymenoptera: Encyrtidae) y *Aprostocetus hagenowii* (Ratzeburg) (Hymenoptera, Eulophidae) muestran las mejores aptitudes como agentes de control biológicos. Son individuos pequeños (por lo general poco visibles para las personas en los hogares), ciclo de vida corto, de comportamiento gregario y las hembras están siempre en mayor número que los machos, esto significa que hay una mayor proporción de hembras buscando ootecas para parasitar (Reirson *et al.*, 2005; Cárcamo *et al.*, 2009). El parasitoide *C. merceti* fue relativamente ineficaz

cuando las densidades de las cucarachas eran bajas, y un gran número de parasitoides tuvieron que ser liberados para mantener las densidades de avispas (Coler *et al.*, 1984). Debido a la baja prevalencia en el ambiente, los parasitoides se han aplicado a través de la liberación inundativa y aumentativa en control de poblaciones de cucarachas a campo. El objetivo del control biológico inundativo es abrumar a la plaga mediante la liberación de gran cantidad de enemigos naturales que resultan en la reducción inmediata de la población de las plagas (Suiter, 1997; Cárcamo *et al.*, 2009).

Nematodos

Dentro del orden Oxyurida (oxiuros), la superfamilia Thelastomatoidea son nematodos parásitos, comensales o saprótrofos de artrópodos terrestres. Ellos viven en el intestino grueso del hospedador y se alimentan por lo general sobre la microfauna de bacterias que se encuentra allí (Jex *et al.*, 2005). En la literatura existe una gran diversidad de especies, por ejemplo *Hammerschmidtella diesingi* y *Leidynema appendiculata* parasitando *P. americana* y *B. orientalis*, *Blatticola blattae* en *B. germanica*, pero aún no se ha demostrado patogenicidad hacia sus hospedadores.

Las Familias Heterorhabditidae Poinar y Steinernematidae Chitwood & Chitwood comprenden a especies de nematodos que presentan una asociación mutualista con bacterias simbiotes y que en conjunto ocasionan la muerte del insecto dentro de las 48 horas. Ambas familias se han probado para el control de cucarachas, principalmente sobre *B. germanica* (Nguyen & Smart, 1996). Se destaca el trabajo de Koehler *et al.* (1992) que demostraron la susceptibilidad de *P. americana*, *P. fuliginosa*, *B. orientalis*, *B. germanica* y *S. longipalpa* al ataque del nematodo *Steinernema carpocapsae* (Weiser) en condiciones de laboratorio. Manweiler *et al.* (1993), probaron una cepa de *S. carpocapsae* para el control de la cucaracha alemana, en una serie de bloques de departamentos, lo que permitió la replicación del ensayo a campo. Los autores citados previamente usaron un prototipo de estaciones de cebo con 2.000.000 de nematodos. Fue efectiva en el control de las cucarachas, causaron alta mortalidad en adultos y ninfas de IV-VI estadio, sin embargo se detectó baja mortalidad en ninfas jóvenes (I-III). Las diferentes etapas de desarrollo de muchos insectos varían en su susceptibilidad a los nematodos y existen entre los insectos comportamientos diferentes que afectan el grado de contacto entre el nematodo y el hospedador que pueden jugar un papel importante en la mortalidad inducida por los nematodos (Begley, 1990; Klein, 1990). Se realizaron ensayos de laboratorio para

probar la susceptibilidad de *P. americana* al nematodo *Heterorhabditis heliothis* (Zervos & Webster, 1989) y fue efectivo. En otro trabajo, se probaron varias especies de nematodos para el control de *P. americana* y *B. germanica*. Sólo dos Steinernematidae (*Steinernema* sp. y *S. carpocapsae*) causaron mortalidad significativa. *H. indica* (Kaya), *H. bacteriophora* Poinar y *S. carpocapsae* (Steiner), no produjeron mortalidad en las cucarachas (Maketon *et al.*, 2010). Los nematodos han mostrado ser eficaces en el control de cucarachas a través de cebos con nematodos. El prototipo de estación de cebo representa una tecnología viable que, cuanto más desarrollada esté, será una parte efectiva del programa integrado para el control de las cucarachas (Manweiler *et al.*, 1993; Appel *et al.*, 1993).

Protistas

Las relaciones simbióticas entre protistas e insectos reflejan toda una gama de posibles interacciones, como el comensalismo, mediante el cual el hospedador proporciona un nicho espacial para el desarrollo del ciclo de vida de los protistas, por ejemplo, *Endamoeba blattae* y los flagelados *Lophomona blattarum* y *Leptomonas* sp. forman parte de la fauna habitual del intestino de las cucarachas (Gile & Slamovits, 2012; Solter *et al.*, 2012). En las relaciones mutualistas tanto el protista como el hospedador se benefician y algunos hospedadores no pueden vivir sin su presencia. Por ejemplo hay flagelados que facilitan la digestión de la celulosa en cierta cucarachas xilófagas (Grandcolas, 1999; Solter *et al.*, 2012). Las gregarinas (Protista: Apicomplexa: Eugregarinida) son parásitos epicelulares y la mayoría parasitan el intestino de las cucarachas, sus efectos patógenicos en el hospedador son mínimos, aunque infecciones graves pueden causar obstrucción intestinal (Solter *et al.*, 2012). Por ejemplo se han citado en cucarachas, *Gregarina blattarum* von Siebold en *B. germanica*; *Blabericola migrator* Clopton en *Gromphadorhina portentosa* Brunner von Wattenwyl (Blattodea: Blaberidae); *Protomaghalensia wolffi* Hays & Clopton en *Nauphoeta cinerea* (Olivier) (Blattodea: Blaberidae) (Clopton, 2009; Clopton, 2012). Los microsporidios, parásitos intracelulares obligados, afectan las funciones básicas de la célula del hospedador (Williams *et al.*, 2014). El ciclo de vida de muchos de los microsporidios, considerados enemigos naturales para las cucarachas, son desconocidos (Suiter, 1997).

Las especies de la Familia Nephridiophagidae Sprague son protistas esporogénicos simbios de los túbulos de Malpighi de los insectos y se han descrito principalmente en los Ordenes de Orthoptera, Coleoptera y Blattodea (Lange, 1993; Haussmann *et al.*, 2003). En general las enfermedades causadas por los protistas son de acción lenta, y en la mayoría de los casos producen infecciones crónicas (Alves & Lecuona, 1998; Boucias & Pendland, 1998), el problema de utilizar a estos organismos como agentes de control biológico se debe a que en general generan bajos niveles de mortalidad y aún no se han podido producir *in-vitro* (Lacey *et al.*, 2001).

Virus

La familia Parvoviridae son virus de ADN con replicación autónoma que pertenecen a dos subfamilias: Parvovirinae, que infectan a vertebrados, y Densovirinae, que infectan a invertebrados (Fédière, 2000). Los Densovirus (DNV) infectan a artrópodos, principalmente a insectos y en la mayoría de los casos las infecciones por DNV causan la muerte del hospedador (Tanada & Kaya, 1993). La mayor parte de la literatura relacionada con los virus de cucarachas proviene de varios artículos sobre un virus en la cucaracha *P. fuliginosa* (Suto *et al.*, 1979). El densovirus aislado de *P. fuliginosa* (PefuDNV), fue purificado de cucarachas enfermas en China (Hu *et al.*, 1994) y se ha producido comercialmente desde 2008 (Wang *et al.*, 2012). El producto fue formulado en combinación con una feromona sexual como una pasta que contiene 6×10^3 partículas / g. La pasta se utiliza en áreas de importancia comercial en la que se encuentran las cucarachas en una alta frecuencia. En 2013, se produjo un total de 5.500 kg de pasta de PefuDNV, que trata un área de cerca de 5,5 millones de m² (Sun, 2015). Radek & Fabel (2000), describen un Entomopoxvirus (EPV) causando infecciones crónicas en *B. germanica*. En 2006, un nuevo virus fue aislado en *B. germanica* densovirus (BgDNV) y purificado a partir de cucarachas alemanas recogidas en el campo (Mukha *et al.*, 2006).

Bacterias

Las cucarachas presentan diferentes tipos de relaciones simbióticas con las bacterias, algunas son beneficiosas para las cucarachas, por ejemplo tienen bacterias simbióticas en las células del cuerpo graso (bacteriocitos) y en los ovocitos, que se les han atribuido funciones relacionadas con el metabolismo y con la reproducción (Cochran *et al.*, 1979; Sacchi & Grigolo, 1989). *Blattabacterium* se encuentran en el

cuerpo graso, y permite a las cucarachas reciclar los uratos en compuestos ricos en nitrógeno (Mullins & Cochran, 1987; Sacchi *et al.*, 2012). El género *Wolbachia* está integrado por bacterias gram-negativas intracelulares obligadas de transmisión vertical (maternal) que infectan a artrópodos (Werren *et al.*, 1995), son consideradas endosimbiontes. Este género pertenece al orden *Rickettsiales*. *Wolbachia* se asocia en los artrópodos con la incompatibilidad citoplasmática, partenogénesis, feminización y la matanza masculina (Charlat *et al.*, 2003). Se las considera parásitos reproductivos ya que en los artrópodos se localizan principalmente en las gónadas y son capaces de inducir alteraciones en la reproducción (Werren *et al.*, 1995). *Wolbachia* se ha detectado en *Blattella* sp. y *S. longipalpa* (Vaishampayan *et al.*, 2007). Aún no se han determinados sus efectos en las cucarachas y su posible utilidad en el control biológico.

Las bacterias patógenas para los insectos se pueden encontrar en una variedad de hábitats en todo el mundo, incluyendo el agua, el suelo, las plantas y animales (Fisher & Garczynski, 2012). Las bacterias patógenas más conocidas para el control de insectos pertenecen al género *Bacillus*. Este grupo ha sido reclasificado recientemente y algunos de los cambios más relevantes se dan a nivel de familia (De Vos *et al.*, 2009). Sin embargo, continuaremos con la clasificación anterior. El género *Bacillus* es un bacilo gram positivo que produce varias proteínas tóxicas, con propiedades insecticidas, que se sintetizan durante la esporulación y forman el cristal paraesporal, las especies de *Bacillus* se dividen en tres grupos morfológicos basados en la forma de las esporas e hinchazón de la célula vegetativa (Gordon *et al.*, 1973; Fisher & Garczynski, 2012). Roth & Willis (1960) reportaron un total de 29 bacterias asociadas a *B. germanica* pero solo dos resultaron patogénicas, *Serratia* sp. y *Bacillus* sp. En otros trabajos han sido probadas algunas cepas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e inocularon bacterias en el agua de los insectos en una dosis de $2,5 \times 10^8$ esporas/ml, causando mortalidad en *B. orientalis*, *B. germanica* y *P. americana* que varió de 0 a 45% (Lonc *et al.*, 1997). Se investigó la habilidad de *B. thuringiensis* para producir septicemia en *P. americana* y *B. orientalis*, por administración de una suspensión oral e inyección intrahemocélica, y solo *B. orientalis* resultó susceptible (Porcar *et al.*, 2006). Las exotoxinas de *Bacillus* sp. generan en las cucarachas alteraciones en el cuerpo y en la hemolinfa, seguido por una desintegración citoplasmática de las células epiteliales intestinales, que lleva a una septicemia y muerte, la mortalidad puede ocurrir de 10 a 20 días después de la infección (Han *et al.*, 2000; Suiter, 1997). Si bien deben realizarse más estudios para determinar

su aplicación a campo algunos aislamientos de especies del género *Bacillus* tienen posibilidades de ser usadas en el control de cucarachas.

Hongos

Pueden dividirse en dos grupos: hongos entomoparásitos que incluyen al orden Laboulbeniales (Ascomycota), son ectoparásitos obligados de ciempiés (Myriapoda: chilopoda), ácaros (Arachnida: Acari) e insectos (Hexapoda: Insecta) (Santamaria, 2003). El Orden contiene casi 2000 especies descritas en el mundo. De ellos, alrededor de 25 especies pertenecen al género *Herpomyces*, que son parásitos de cucarachas (Guthrie & Tindall, 1968; Roth & Willis, 1960). Se fijan al hospedador a través del haustorio, que penetra en la cutícula de la cucaracha y entra entre las células causando una dermatitis con la histopatología característica; sin embargo, no hay evidencia de la patogenicidad (Richards & Smith, 1956). En las cucarachas se encuentran parasitando principalmente las antenas, los palpos del aparato bucal, abdomen y en los fémures de las patas. El género *Herpomyces* es altamente específico de cucarachas y en general no se ha demostrado que tenga algún efecto adverso en el hospedador (Suiter, 1997). Sin embargo, existe evidencia que en las crías de laboratorio pueden ocasionar graves problemas, como los descritos en el trabajo de Gemenio *et al.*, 2004, sobre ninfas y adultos de la cucaracha de la madera, *Parcoblatta lata* (Brunner), donde desarrollaron una severa infección por *Herpomyces* spp. en las colonias de laboratorio.

El segundo grupo, los hongos entomopatógenos, ha sido reclasificado en los últimos años utilizando técnicas moleculares, dentro del Orden Hypocreales en el Phylum Ascomycota, y acoplado a sus teleomorfos (por ejemplo, *Cordyceps* spp.). Estos hongos invaden al hospedador a través del tegumento externo, o través del tracto digestivo. Los conidios se unen a la cutícula, penetran y germinan dentro del hospedador. Una vez en el hemocele, las hifas colonizan todos los tejidos del hospedador. La muerte del insecto se debe a una combinación de la acción de las toxinas fúngicas, obstrucción física de la circulación de la hemolinfa, agotamiento de los nutrientes, y la invasión de órganos por parte del hongo. Después de la muerte del insecto, las hifas generalmente emergen del cadáver, si las condiciones de temperatura y humedad son adecuadas, y producen conidios en el exterior del hospedador (Inglis *et al.*, 2012). En la última década se evaluaron los efectos del uso de los hongos entomopatógenos para el control de cucarachas como *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales) contra *B. germanica* y *P. americana*, evaluando su

virulencia y rango hospedador (Hernandez-Ramirez *et al.*, 2007; Quesada Moraga *et al.* 2004; Lopes & Alves 2011; Hubner-Campos *et al.*, 2013). Otros estudios se centraron en combinaciones de *M. anisopliae* y productos químicos para mejorar la eficacia en el campo, aplicando dosis subletales de insecticidas. Kaakeh *et al.* (1997) probaron un cebo contra la cucaracha alemana, con *M. anisopliae* y el insecticida imidacloprid y obtuvieron un efecto sinérgico. Zurek *et al.* (2002) demostraron que el ácido bórico aumenta la actividad patogenica del hongo *M. anisopliae*. El uso de combinaciones de agentes patógenos con otros productos puede aumentar o disminuir la eficiencia en campo de los agentes patógenos. En el mercado a nivel mundial existen una gran cantidad de productos formulados a base de hongos entomopatógenos para el control de insectos (Faria & Wraight, 2007). Para el control de cucarachas la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU registro en 1993 un producto a base de *M. anisopliae*, llamado Bio-Path, (EcoScience Corporation, Worcester, MA, EE.UU.), pero en el campo la falta de eficacia y el control lento llevó a su suspensión. Los hongos entomopatógenos parecen ser uno de los grupos más prometedores para usar en el control de cucarachas.

HIPOTESIS

Los patógenos pueden reducir el nivel poblacional de las cucarachas domiciliarias y disminuir el uso de insecticidas.

EL OBJETIVO GENERAL

Desarrollar estrategias compatibles con el ambiente tendiente a lograr la reducción de la densidad de cucarachas en ambientes urbanos mediante el empleo de patógenos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Aislar e identificar parásitos y patógenos de cucarachas.
- (2) Evaluar la patogenicidad en condiciones de laboratorio de los organismos aislados en cucarachas así como de hongos y bacterias aislados en otros insectos.
- (3) Desarrollar métodos para la producción “*in vivo*” y/o “*in vitro*” de los patógenos que presenten mejores atributos como agentes de control microbiano de cucarachas.

- (4) Instalar y mantener colonias de las especies de cucarachas más comunes en Argentina para realizar las evaluaciones de los aislamientos nativos.
- (5) Identificar endosimbiontes, preferentemente bacterias del género *Wolbachia* en cucarachas y estudiar la relación con el hospedador.

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Áreas de recolección de cucarachas y transporte de los insectos

Los insectos objeto de estudio fueron recolectados en localidades del Partido de La Plata y gran Buenos Aires. La mayoría de las prospecciones se realizaron durante los meses de julio a diciembre de 2010 y de enero a diciembre de 2011 y 2012. Las capturas de cucarachas se realizaron en domicilios, oficinas, restaurantes, zoológico (previa autorización). La búsqueda de cucarachas se realizó en forma manual, o se colocaron trampas con cebos. Las trampas se confeccionaron de forma casera cortando una botella plástica en el primer tercio y colocándolo como un embudo en su interior. Las paredes exteriores se pintaron de negro y en las paredes internas se colocó vaselina para que las cucarachas entrarán, pero no escaparán (Fig. 8). Se usó un cebo que consistió en alimento para perro seco triturado con dulce de membrillo y en las habitaciones infestadas con *B. germanica* se colocó pan embebido en cerveza. El cebo fue remplazado cada 1 o 2 días para mantenerlo atractivo. En función del nivel de infestación de las cucarachas, las trampas fueron revisadas después de 24 a 48 horas. Las trampas fueron colocadas en el domicilio y el peridomicilio.

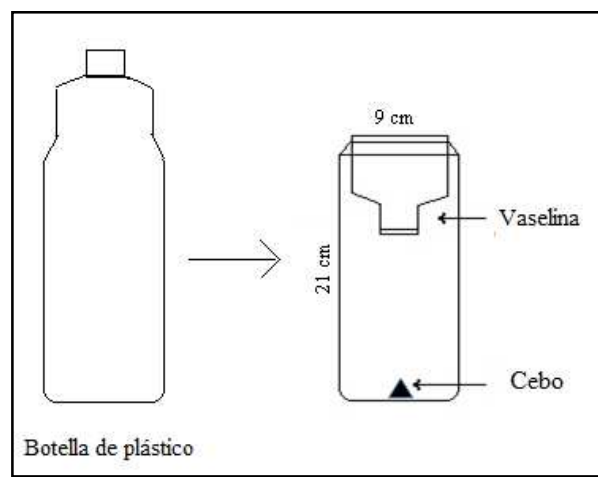


Figura 8. Trampa casera para cucarachas.

La colocación correcta de las trampas fue muy importante para maximizar su eficacia. Las trampas fueron colocadas en lugares donde era probable que se escondan las cucarachas, como por ejemplo debajo de la mesada de la cocina, áreas alrededor del

refrigerador, estufa, la despensa de alimentos y los lavaderos. Las trampas fueron colocadas contra una pared o una superficie vertical. Los indicios indirectos de infección como las heces y las mudas, indican la cercanía del lugar donde anidan (Fig. 9). En el caso de las cucarachas peridomiciliarias las heces en general indican una zona de paso, como por ejemplo, garajes, galpones, lavaderos o cerca de la rejilla de la cloaca ya que no es común que aniden dentro del hogar. Las heces de *B. germanica* se ven como puntos negros que asemejan a granos de café molido (Fig. 9), las heces de las especies de *Periplaneta* y *B. orientalis* son de mayor tamaño y cilíndricas. También se recolectaron ootecas en diferentes zonas del hogar como detrás de muebles, maderas, libros, etc. Los insectos capturados fueron colocados en recipientes plásticos acondicionados. En todos los casos se consignó la localidad, fecha de colecta, y el sitio específico de recolección. Los insectos recolectados en los diferentes ambientes se colocaron en frascos plásticos individuales, para evitar contaminaciones que alteren la prevalencia natural de los patógenos y fueron transportados hasta el laboratorio.



Figura 9. Infección de *B. germanica* localizada en un bajo mesada de una cocina en una casa familiar. En la foto de la derecha, se ven los restos de mudas y heces (marcados con flecha blanca). En la foto de la izquierda, se ven las manchas de heces en las paredes que se encuentran a la entrada del nido.

Mantenimiento en el laboratorio de los insectos recolectados

Las cucarachas recolectadas en el campo fueron mantenidas en ambientes especialmente acondicionados en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, CEPAVE (UNLP-CONICET). Los insectos fueron mantenidos en un Insectario a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $60\% \pm 5\%$ de humedad relativa y un fotoperíodo de 12:12 (luz: oscuridad), con estanterías verticales donde se colocaron los recipientes plásticos con las cucarachas recolectadas. Los insectos fueron mantenidos individualmente en recipientes plásticos, con una tela de nylon en su abertura y con cartón corrugado colocado en su interior.

Instalación y mantenimiento de colonias de cucarachas en el laboratorio

Los bioensayos se realizaron utilizando insectos de las colonias de cucarachas instaladas y mantenidas en el CEPAVE. Estas colonias se generaron a partir del muestreo realizado en la ciudad de La Plata durante el año 2011 y 2012. Se utilizó el método estandarizado para la cría masiva de *B. germanica* y *P. americana* reportado por Heal (1948) y Cornwel (1968). Los ejemplares colectados se colocaron en recipientes amplios (30 x 25 x 20 cm) de plástico cubiertos en su parte superior por una tela de nylon (Fig. 10). Se colocó una capa fina de vaselina líquida en el borde superior interior de cada recipiente para evitar la fuga de los insectos. Cada recipiente fue identificado con el nombre de la especie, lugar de origen, fecha de colecta y nombre del colector.

Las cucarachas fueron alimentadas con comida seca para perro triturada ("pellets"), ya que se ha reportado que al alimentar con pellets completos a ninfas de *B. germanica* el desarrollo es más lento (Cooper & Schal, 1992). En cada recipiente se colocaron maples de huevo para proporcionar refugio y una superficie para que las especies ovíparas adhieran las ootecas. El agua fue suministrada *ad-libitum* en recipientes de plástico de 250 cm^3 con la tapa perforada y con un algodón en su interior. Las cucarachas se mantuvieron en un ambiente a $26 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa de $60 \pm 10\%$ y un fotoperíodo de 12:12 (luz: oscuridad). Los recipientes se limpiaron una vez por semana retirando los restos de insectos muertos, heces, cartones sucios y humedecidos. En consecuencia, si el aseo no se realiza correctamente se produce un aumento de la humedad dentro de las cajas de cría, generando el crecimiento de contaminantes que atraen insectos perjudiciales, como las moscas, pudiendo llegar a perder la colonia.

La dieta puede afectar la habilidad reproductiva de las cucarachas (Roth & Willis, 1954), al igual que su crecimiento y desarrollo (Cooper & Schal, 1992; Aguilera *et al*, 1998). El alimento se cambió una vez por semana. La fuente de proteínas (Kunkel, 1981) fue el alimento seco para perros. Sin embargo, hay modificaciones en la dieta según la especie por ejemplo, la dieta de la cucaracha oriental fue complementada con rodajas de papa como fuente de hidrato de carbono, sino las ootecas no eclosionaban y los adultos vivían menos tiempo. A la cucaracha *B. germanica* se le colocó una vez por semana una capa fina de levadura de cerveza en polvo, ya que estas cucarachas prefieren alimentos fermentados. La dieta de *B. dubia* fue suplementada con rodajas de manzana y papa.

La humedad es un factor limitante para el desarrollo de algunas especies de cucarachas, principalmente las especies de *Periplaneta*, que necesitan 70 % HR para que las ootecas eclosionen en un tiempo corto, las ootecas fueron separadas en tubos de vidrio y colocadas en una incubadora para obtener ninfas.



Figura 10. Colonia de cucarachas instaladas en el CEPAVE (Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores).

Identificación de los ejemplares recolectados

Los ejemplares recolectados en el campo fueron identificados a nivel específico, consignándose además el estadio y el sexo de cada cucaracha recolectada. La identificación taxonómica de los insectos se realizó utilizando las claves taxonómicas de Gordon (1992), Cochran (1999) y Crespo & Valverde (2005).

Metodología para la detección, aislamiento e identificación de parásitos y patógenos

Monitoreo de infecciones: La prospección de parásitos y patógenos se llevó a cabo en ninfas y adultos. Las cucarachas fueron colocadas en recipientes plásticos para su traslado al laboratorio. En el laboratorio se realizó un examen macroscópico de las cucarachas que se observaron individualmente bajo el microscopio estereoscópico para detectar alteraciones en la movilidad, color, morfología y comportamiento. Las alteraciones externas detectadas fueron registradas y fotografiadas con una cámara digital Lumix de Panasonic DMC-F2. Los ejemplares que presentaron alteraciones y/o anomalías fueron los primeros en ser disecados y sus tejidos y órganos examinados microscópicamente para detectar la presencia de parásitos y/o patógenos.

Identificación de parásitos y patógenos

Los parásitos y patógenos comunes en insectos son: bacterias, hongos, protistas y nematodos. La metodología a utilizar para el aislamiento, identificación y estudio varía con cada patógeno y dentro de ellos, según la familia, género y especie hallada. Las técnicas básicas estándares que se seguirán en este estudio para cada parásito son las descritas por:

* Bacterias: identificación, aislamiento, cultivo y preservación (Thiery & Franchon, 1997; Zhou *et al* 1998).

* Protistas: identificación, propagación, transmisión (Undeen & Vavra 1997) (Clopton, 2002).

* Hongos: aislamiento, identificación, cultivo (Humber, 1997), Entomophthorales (Papierok & Hajek, 1997), Hyphomycetes (Goettel & Inglis, 1997).

* Nematodos: identificación, cultivo, cuantificación, preservación (Kaya & Stock, 1997).

Las técnicas de microscopía óptica y electrónica a emplear, para el estudio de los patógenos, son las descritas por Becnel (1997). Los protocolos a utilizar en biología molecular son los descritos por O'Neill *et al.*, (1992) y Vaishampayan *et al.*, (2007). La evaluación de la patogenicidad de los parásitos y patógenos aislados se realizó mediante la implementación de bioensayos siguiendo la metodología descrita por Navon & Ascher (2000).

Disección de las cucarachas

Las cucarachas fueron anestesiadas, antes de la disección, con dióxido de carbono (CO₂) durante 10 segundos y se cortaron las alas, las patas (a nivel de las coxas) y las antenas. El insecto, se inmovilizó con alfileres entomológicos colocados a los laterales del pronoto, con la región ventral hacia arriba sobre una placa de poliestireno expandido o sobre una placa de parafina (Fig. 11 a). Se colocó solución fisiológica sobre el abdomen para evitar el desecamiento al cortar las pleuras.

Utilizando una tijera para cirugía óptica se cortaron las pleuras a nivel del abdomen hasta el tórax, se retiró la cutícula que cubre la región ventral del abdomen y tórax dejando al descubierto los órganos (Figs. 11 b, c). Con una pinza se tomó el esófago y con otra la ampolla rectal, colocando los tejidos y órganos en una cápsula de Petri con solución fisiológica (Fig. 11 d). Las estructuras anatómicas se examinaron detalladamente al microscopio estereoscópico a fin de detectar anomalías o presencia de organismos en los tejidos, órganos o cavidades del insecto. Se realizaron extendidos y preparados entre porta y cubreobjetos de los diferentes tejidos y órganos como el cuerpo graso, intestino, tubos de Malpighi, hemolinfa, ovario y testículo.

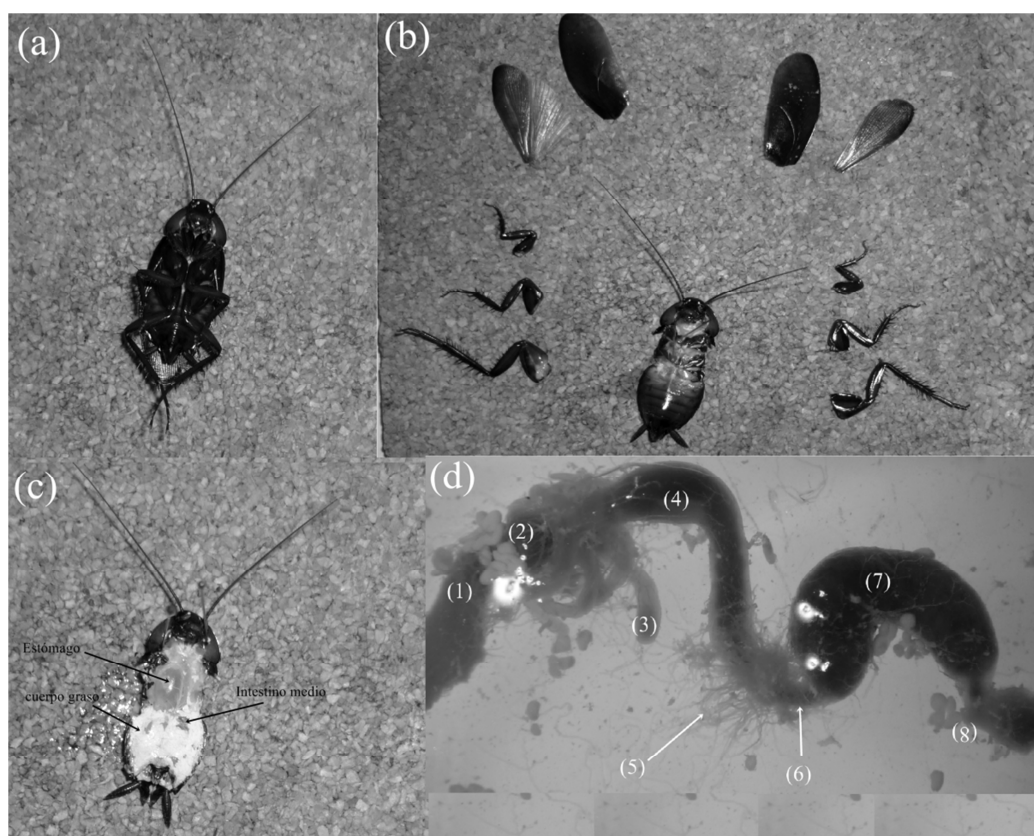


Figura 11. Disección de *P. fuliginosa*. (a) cucaracha anestesiada; (b) corte de alas y patas; (c) órganos expuestos, (d) tubo intestinal, 1-buche, 2-proventrículo, 3-ciegos intestinales, 4- intestino medio, 5-túbulos de Malpighi, 6- íleon, 7- colon (intestino grueso), 8- ampolla rectal.

Examen microscópico de los insectos

Luego de disecados los ejemplares, se realizaron preparaciones de los tejidos y órganos y se observaron al microscopio óptico con contraste de fases. Se realizaron preparaciones en fresco entre porta y cubreobjetos, donde se colocaron trozos pequeños de tejidos y órganos entre porta y cubreobjetos agregando una gota de solución fisiológica. Esta preparación permitió registrar la forma, tamaño y movilidad de los parásitos, evitando las modificaciones producidas por la fijación y coloración de las estructuras. Se realizaron preparados permanentes con coloraciones vitales específicas según los grupos de patógenos detectados. Las metodologías específicas serán detalladas en los capítulos correspondientes a cada grupo de patógenos.

RESULTADOS GENERALES

Áreas de recolección de cucarachas

Las colectas se realizaron en domicilios y peridomicilios (Tabla 2). Durante el período de muestreo (2010 a 2012) se realizó el relevamiento de cucarachas en diferentes barrios de la ciudad de La Plata y provincia de Buenos Aires para la prospección de patógenos. Las áreas de estudio correspondieron al interior de hogares de familia y los fondos de las viviendas (peridomicilio), las calles aledañas a los hogares y el zoológico de La Plata. En los diferentes sitios de colecta *P. fuliginosa* se encontró en 6 áreas de muestreo, tanto dentro del domicilio como el peridomicilio. *P. americana* se observó en 4 áreas de muestreo, dentro del domicilio y el peridomicilio. *B. germanica* se observó en 4 áreas de muestreo solo dentro de los hogares. En relación con el nivel de infección en los hogares *B. germanica* mantuvo un número de individuos por muestreo muy altos en comparación con las especies de *Periplaneta* (Fig. 7). *Blatta orientalis* solo se encontró en los meses de verano en dos áreas de muestreo, una en el peridomicilio y en árboles ubicados sobre la calle. *B. dubia* se detectó en un solo punto de muestreo ubicado en el peridomicilio en la ciudad de La Plata, sin embargo, se obtuvo un núcleo de estas cucarachas desde un tronco ubicado en el peridomicilio de una casa en Tandil, provincia de Buenos Aires. *P. nivea* se recolectó en el peridomicilio en una casa ubicada en Los Hornos (Tabla 2). El mayor número de cucarachas urbanas recolectadas en la ciudad de La Plata fue de *B. germanica*; seguido por *P. fuliginosa*; *P. americana* y *B. orientalis* (Tabla 3). La mayor frecuencia en el muestreo la presentó *P. fuliginosa*.



Figura 12. (a) Nido de *P. fuliginosa*, cucaracha peridomiciliaria, cerca de una enredadera en el hueco de una pared. (b) nido de *B. germanica*, cucaracha domiciliaria, debajo de una mesada en una cocina.

Parásitos y patógenos hallados en cucarachas

De los 1146 ejemplares de *P. fuliginosa*, *P. americana*, *B. orientalis*, *B. germanica*, *B. dubia* y *P. nivea*, 258 fueron disecados y 237 fueron colocados en cámaras húmedas o medio selectivo para hongos entomopatógenos (Anexo) (Tabla 3). Como resultado de la prospección de parásitos y patógenos en las cucarachas examinadas fueron identificados: tres especies de gregarinas, un eucariota unicelular esporogénico, dos especies de nematodos y una bacteria endosimbionte. No se detectaron hongos entomopatógenos en las cucarachas recolectadas, solo se desarrollaron hongos saprótrofos como *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Alternaria* sp. y *Mucor* sp. Sin embargo, se pudieron detectar e identificar hongos entomopatógenos en cucarachas silvestres (Capítulo VI).

En este capítulo solo se detallan los resultados generales, las metodologías y los resultados específicos obtenidos se describen en los capítulos que se desarrollan a continuación. Parte del material recolectado fue preservado para estudios futuros.

Actualmente se crían en el CEPAVE cinco especies de cucarachas que son *P. fuliginosa*, *P. americana*, *B. orientalis*, *B. germanica* y *B. dubia*. No fue posible mantener una cría de *P. nivea* (Tabla 3).

Tabla 3. Prospección y cría y de cucarachas

	Disección (1)	CH o Ms (2)	Inicio de Cría (3)	Totales
<i>P. fuliginosa</i>	100	86	160	346
<i>P. americana</i>	63	40	70	173
<i>B. orientalis</i>	8	6	23	37
<i>B. germanica</i>	20	70	280	370
<i>B. dubia</i>	50	25	78	153
<i>P. nivea</i>	17	10	40	67
Totales	258	237	651	1146

(1) número de cucarachas disecadas (Ninfas y adultos)

(2) CH: cámara húmedas o Ms: medio selectivo para hongos entomopatógenos (Ver Anexo)

(3) insectos para iniciar la cría en el CEPAVE

Tabla 2: Localidades y ambientes donde se recolectaron los ejemplares de las diferentes especies de cucarachas en la provincia de Buenos Aires.

	Ubicación	Localidad	Coordenadas Geograficas (lat/long)	Fecha de Muestreo	Ambiente	especie
1	Barrio Altos de San Lorenzo	P. La Plata	34° 56' 26.7" S/ 57° 56' 10.62" W	2010-2012	domicilio y peridomicilio	<i>P. fuliginosa</i>
2	Barrio Altos de San Lorenzo	P. La Plata	34° 57' 3.9" S/ 57° 56' 7.59" W	2010-2012	domicilio y peridomicilio	<i>P. fuliginosa</i>
3	Casco urbano	P. La Plata	34° 54' 21.34" S/ 57° 56' 57.06" W	nov-10	arboles de tilo y veredas	<i>B. orientalis</i>
4	La granja	P. La Plata	34° 55' 5.41" S/ 58° 1' 2.65" W	nov-10	peridomicilio	<i>P. fuliginosa</i>
5	Casco urbano	P. La Plata	34° 54' 19.98" S/ 57° 57' 2.05" W	2010-2012	domicilio y peridomicilio	<i>P. americana</i>
6	Barrio Altos de San Lorenzo	P. La Plata	34° 56' 26.7" S/ 57° 56' 10.62" W	nov-10	peridomicilio	<i>B. orientalis</i>
7	Casco urbano	P. La Plata	34° 54' 22.82" S/ 57° 56' 14.88" W	mar-abril y mayo 2011	domicilio	<i>B. germanica</i>
8	Los Hornos	P. La Plata	34° 58' 0.53" S/ 57° 59' 16.85" W	jun-11	peridomicilio	<i>Panchlora nivea</i>
9	Casco urbano	P. La Plata	34° 55' 29.42" S/ 57° 55' 30.53" W	2011-2012	domicilio	<i>P. fuliginosa</i>
10	La granja	P. La Plata	34° 55' 5.41" S/ 58° 1' 2.65" W	2011-2012	domicilio	<i>P. americana</i>
11	Barrio Altos de San Lorenzo	P. La Plata	34° 56' 19.43" S/ 57° 55' 55.32" W	feb-11	peridomicilio	<i>Blaptica dubia</i>
12	Casco urbano	P. La Plata	34° 56' 24.83" S/ 57° 57' 48.18" W	ago-11	domicilio	<i>B. germanica</i>
13	Casco urbano	P. La Plata	34° 56' 26.99" S/ 57° 57' 49.73" W	dic-11	domicilio	<i>P. americana</i>
14	Casco urbano	P. La Plata	34° 54' 59.02" S/ 57° 55' 45.98" W	2012	domicilio	<i>P. americana</i>
15	Casco urbano	P. La Plata	34° 55' 29.42" S/ 57° 55' 30.53" W	2012	domicilio	<i>B. germanica</i>
16	Barrio Altos de San Lorenzo	P. La Plata	34° 57' 11.17" S/ 57° 56' 43.18" W	2012	domicilio y peridomicilio	<i>P. fuliginosa</i>
17	Los Hornos	P. La Plata	34° 57' 4.09" S/ 57° 57' 52.93" W	feb-12	domicilio	<i>B. germanica</i>
18	Ciudad de Tandil	prov. Buenos Aires	37° 20' 7.07" S/ 59° 8' 14.83" W	jun-12	peridomicilio	<i>Blaptica dubia</i>
19	Casco urbano	P. La Plata	34° 55' 46.63" S/ 57° 57' 5.39" W	dic-12	domicilio	<i>P. fuliginosa</i>

P. La Plata: Partido de la Plata, provincia de Buenos Aires

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera L., Marquetti M.C, Fuentes O y Navarro A. 1998 . Efecto de dos dietas sobre aspectos biológicos de *Blatella germanica* (Dictyoptera: Blatellidae) en condiciones de laboratorio. Rev. Cub. Med. Trop. 50(2):143-9.
- Alves S.B. & Lecuona R. (1998). Epizootiología aplicada ao controle microbiano de insetos. En: Alves, S. B. (ed.), Controle microbiano de insetos. 2. ed. Bibioteca de Ciencias Agrarias Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brasil, pp. 97-163.
- Appel A.G., Benson E.P., Elleenberger J.M., Manweller S.A. (1993). Laboratory and field evaluation of entomogenous nematode (Nematoda: Steinernematidae) for German cockroach (Dictyoptera: Blattidae) control. J. Econ. Entomol.86 (3): 777-784.
- Appel A.G. & Smith L.M. (2002). Biology and management of the smokybrown cockroach. Annu. Rev. Entomol., 47, 33-55.
- Barbara K.A. (2005). American Cockroach, *Periplaneta Americana* (Linnaeus) (Insecta: Blattodea: Blattidae). Document N° EENY-141 (IN298).Published by Department of Entomolgy and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.<http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Becnel J.J. (1997). Complementary techniques: Preparations of entomopathogens and diseased specimens for more detailed study using microscopy. In: Manual of techniques in insect pathology. Lacey, L (ed.), Chapter VIII-1. Pp. 337-353.
- Begley J.W. (1990). Efficacy Against Insects in Habitats Other Than Soil. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control.pp. 215-232 (ed. by R. Gaugler and H. K. Kaya). CRC Press, Inc.
- Bell W.J. & Adiyodi K.G. (1981). Reproduction. In: "The American Cockroach", W. J. Bell, and Adiyodi, K. G., Eds., Chapman & Hall; NY.
- Blanco M.V., Lax P., Rondan Dueñas J.C., Gardenal C.N. and Doucet M.E. (2012). Morphological and molecular characterization of the entomoparasitic nematode *Hammerschmidtella diesingi* (Nematoda, Oxyurida, Thelastomatidae).Acta Parasitol. 57(3), 302–310.

- Boucias D.G. & J.C. Pendland. (1998). Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers, Boston 537 p.
- Camino N.B. & Gonzales S.E. (2012). Cuatro especies simpátricas de Thelastomatidae (Nematoda) parásitas de la cucaracha americana *Periplaneta americana* (L.) (Blattodea, Blattidae) en La Plata, Argentina. Neotrop. Helminthol. 6(2): 239-246.
- Camino N.B. & Quelas M.A. (2008). Descripción de *Thelastoma domesticus* sp. nov. (Oxyurida, Thelastomatidae) parásita de ninfas *Periplaneta americana* (Blattodea, Blattidae) en Argentina. Iheringia, Série Zoologia 98:24-27.
- Cárcamo M.C., Brandão K.R., Costa V.A., Ribeiro P.B. (2009). Ocorrência de *Aprostocetus hagenowii* (Hymenoptera, Eulophidae), parasitoide de ootecas da barata americana, no Rio Grande do Sul. Ciência Rural, Santa Maria, Vol. 39. Nro.9: 2649-2651.
- Charlat S., Hurst G.D.D., Mercot H. (2003). Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. Trends Genet. 19 (4), 217–223.
- Clopton R.E. (2002). Phylum Apicomplexa Levine, 1970: Order Eugregarinorida Léger, 1900. Pp. 205-288. In: Illustrated Guide to the Protozoa, 2nd edition, J. J. Lee, G. Leedale, D. Patterson, and P. C. Bradbury, eds. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas
- Clopton R.E. (2009). Phylogenetic relationships, evolution, and systematic revision of the septate gregarines (Apicomplexa: Eugregarinorida: Septatorina). Comp. Parasitol. 76: 167–190.
- Clopton R.E. (2012). Synoptic revision of Blabericola (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae) parasitizing blaberid cockroaches (Dictyoptera: Blaberidae), with comments on delineating gregarine species boundaries. J. Parasitol. 98(3):572-83.
- Cochran D.G. (1989). Monitoring for insecticide resistance in field- collection strain of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 82, 336-341.
- Cochran D.G. (1995). Toxic effects of boric acid on the German cockroach. Experientia 51(6), pp 561-563.
- Cochran D.G. (1999). Cockroaches their biology, distribution and control. World Health Organization, Communicable Diseases Prevention and Control and WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES). WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.3 pp.1-83.

- Cochran, D.G. (2003). Blattodea. In: resh, V. H., Carde, R. T. (Eds.), Encyclopedia of Insects. Academic Press, New York, pp. 123-126.
- Cochran D.G., Mullins D.E., Mullins K.J. (1979). Cytological changes in the fat body of the American cockroach, *Periplaneta americana*, in relation to dietary nitrogen levels. Ann. entomol. Soc. Am. 72: 197-205.
- Coler R.R., Van Driesche R.G., Elkinton, J.S. (1984). Effect of an oothecal parasitoid *Comperia merceti* (Compere) (Hymenoptera: Encyrtidae) on a population of the brown-banded cockroach (Orthoptera: Blattellidae). Environ. Entomol.13:603-6.
- Cooper R.A. & Schal C. (1992). Differential development and reproduction of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) on three laboratory diets. J. Econ. Entomol. 85(2): 838-44.
- Cornwell P.B. (1968). The Cockroach, Vol. I, Hutchinson, London, 391 pp.
- Crespo F.A. & Valverde A.C. (2005). *Blattaria*, cucarachas. En: Salomón, O. D. (ed.). Artrópodos de interés médico en Argentina, Fundación Mundo Sano, Buenos Aires. pp. 120.
- Crespo F.A. & Valverde A.C. (2008). Blattaria. In: Biodiversidad de Artrópodos Argentinos (Eds Sociedad Entomológica Argentina), Vol. 2 pp. 167-179. Mendoza, Argentina.
- De Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. and Whitman W.B. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd ed.). New York, NY: Springer.
- Edmunds L.R. (1953). Some notes on the *Evaniidae* as household pests and as a factor in the control of roaches. Ohio J. Sci.,53, 121-122.
- FAO/WHO. (2010). Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides.Prepared by the FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Specifications (JMPS).Second edition. (WHO) world health organization and (FAO) food and agriculture organization of the United Nations.
- Faria M.R. & Wraight S.P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol. Control. 43:237-256

- Fédière G. (2000). Epidemiology and pathology of Densovirinae. *Contrib. Microbiol.* 4, 1–11.
- Fisher T.W. & Garczynski S.F. (2012). Isolation, culture, preservation, and identification of entomopathogenic bacteria of the Bacilli. In: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Lacey, L (ed.), Chapter III. Pp. 75-96.
- Gemenó C., Zurek L., Schal C. (2004). Control of *Herpomyces* spp. (Ascomycetes: Laboulbeniales) infection in the wood cockroach, *Parcoblatta lata* (Dictyoptera: Blattodea: Blattellidae), with benomyl. *J. Invertebr. Pathol.* 85. 132–135.
- Gile G.H. & Slamovits C.H. (2012). Phylogenetic Position of *Lophomonas striata* Bütschli (Parabasalia) from the Hindgut of the Cockroach *Periplaneta americana*. *Protist.* 163(2):274-83.
- Goettel M.S. & Inglis D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. En *Manual of techniques in insect pathology*”. Lacey L. (ed.). Chapter V-3. Pp. 213-249.
- Gordon J.M. (1992). Comparison of midinstar nymphs of *Periplaneta fuliginosa* (Serville) and *Periplaneta americana*(L.) (Blattodea: Blattidae). *Proc. Entomol.Soc. Wash.*94:151–56
- Gordon R., Haynes W., Pang C. (1973). The genus *Bacillus*. U.S. Dept. of Agriculture Handbook No. 427. pp. 291.
- Grandcolas P. (1996). The phylogeny of cockroach families: a cladistic appraisal of morpho-anatomical data. *Can. J. Zool.*, 74: 508-527.
- Grandcolas P. (1999). El origen de la diversidad en las cucarachas: perspectiva filogenética de su gregarismo, reproducción, comunicación y ecología. *Bol. S.E.A.*, Nº 26: 397-420
- Guthrie D.M., Tindall A.R. (1968). *The Biology of the Cockroach*. St. Martins Press, New York.
- Han W.D., Choi J.E., Lim C.S., Cho H.W., Baek K.S., Choi J.H., and Seong C.N. (2000). Insecticidal effect of *Bacillus* isolate on *Periplaneta americana*. *Kor. J. Entomol.* 30: 275-282
- Hausmann, K., N. Hülsmann & R. Radek. 2003. *Protistology*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

- Heal M.E. (1948). Rearing methods for German and American cockroaches. J. Econ. Entomol. 41:329.
- Hernández-Ramírez G.F., Hernández-Rosas H., Sánchez-Arroyo and Alatorre-Rosas R. (2007). Infectividad, edad y humedad relativa relacionados con la susceptibilidad de ninfasy adultos de *Periplaneta americana* a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria Bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Entomotrópica.22: 27–36.
- Holbrook G.L., Roebuck J., Moore C.B., Waldvogel M.G., Schal C. (2003). Origin and extent of resistance to fipronil in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol. 96: 1548-1558.
- Hubner-Campos R.F., Leles R.N., Rodrigues J., Luz C. (2013). Efficacy of entomopathogenic hypocrealean fungi against *Periplaneta americana*. Parasitol.Intern. 62: 517-521.
- Hu Y.Y., Zhang J.M., Lizuka T., Bando H. (1994). A densovirus newly isolated from the smoky-brown cockroach *Periplaneta fuliginosa*. Arch. Virol.138, 365–372.
- Humber R.A. (1997). Fungi: Identification. En: Manual of techniques in insect pathology. L. Lacey (ed.). Chapter V-1. Pp : 153-185.
- Inglis G.D., Enkerli J. and Goettel M. S. (2012). Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: Manual of Techniques in Invertebrate Pathology . Lacey, L.A. (ed.). Chapter VII. Pp:189-251.
- Jacobs S.B. (2013). American cockroaches, *Periplaneta Americana* (L.). HP-4. Entomological Notes Printed by The Pennsylvania State University.
- Jex A.R., Schneider M.A, Rose H.A. & Cribb T.H. (2005). The Thelastomatoidea (Nematoda: Oxyurida) of two sympatric Panesthiinae (Insecta: Blattodea) from south-eastern Queensland, Australia: taxonomy, species richness and host specificity. Nematol. 7: 543-575.
- Jones S. C. (2008). American cockroach. Document number HYG-2096-08. Extension. The Ohio State University.
- Kaakeh W.B.L., Reid T.J., Bohnert and Bennet.G.W. (1997). Toxicity of imidacloprid in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae), and the synergism between imidacloprid

- and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect fungi:Hyphomycetes). J. Econ. Entomol. 90: 473:482.
- Kaya, H. & Stock P. (1997). Techniques in insect nematology. In: Manual of techniques in insect pathology. Lacey L. (ed.).Chapter VI. Pp .281-324.
- Klein M. (1990). Efficacy Against Soil-inhabiting Insect Pests. In: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. pp. 195-214 (ed. by R. Gaugler and H. K. Kaya). CRC Press, Inc.
- Kristensen M., Klingenberg Hansen K., Vagn Jensen K.M. (2005). Cross resistance between dieldrin and fipronil in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). J. Econ. Entomol.98: 1305-1310.
- Koehler P.G., Bayer B.E. and Branscome D. (2013). Cockroaches and their management. ENY-214 (IG082). Department of Entomolgy and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 1-6. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IG/IG08200.pdf>
- Koehler P.G. & Castner J.L. (2012). The German Cockroach. Document N° SP147.Published by Department of Entomolgy and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Koehler P.G., Patterson R.S., Martin W.R. (1992). Susceptibility of cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae, Blattidae) to infection by *Steinernema carpocapsae*. J. Econ. Entomol. 85 (4): 1184-1187.
- Kunkel J.G. (1981). A minimal model of metamorphosis: fat body competence to respond to juvenile hormona. In: Ghovindan B., Friedman S. Rodríguez J.G. Eds. Current Topies in insect endocrinology and nutrition. New York, Plenum. 107-29.
- Lacey L.A., Frutos R., Kaya H.K. and Vail P. (2001). Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. Biol. Control. 21, 230-248.
- Lange C.E .(1991). Ultraestructura de los plasmodios de *Coelosporidium periplanetae* (Lutz y Splendore) (Protoctista: Protozoa): interacción con las células del hospedador y formación de esporoblastos. Neotropica 37: 127-136

- Lange C.E. (1993). Unclassified protists of arthropods: the ultrastructure of *Nephridiophaga periplanetae* (Lutz & Splendore, 1903) n. comb., and the affinities of the Nephridiophagidae to other protists. J Euk Microbiol 40:689–700.
- Lin L.F., Lu W.C., Cai S.W. (2000). Monitoring for insecticide resistance in field collected strains of the German cockroach in Guangdong. Chin. J. Vec. Biol. Contr. 11: 32-34.
- Lebeck L.M. (1991). A review of the hymenopterous natural enemies of cockroaches with emphasis on biological control. *Entomophaga*. 36 (3): 335-352.
- Lemos A.A., Lemos J.A., Prado M.A., Pimenta F.C., Gir E., Silva H.M. & Silva M.R.R. (2006). Cockroaches as carriers of fungi of medical importance. Mycoses. 49, 23-25.
- Lonc E., Lecadet M.M., Lachowicz T.M. and Panek, E. (1997). Description of *Bacillus thuringiensis wratislaviensis* (H-47), a new serotype originating from Wrocław (Poland) and other *Bt* soil isolates from the same area. Lett. in Appl. Microbiol.. 24, 467–473.
- Lopes R.B. & Alves. S.B. (2011). Differential susceptibility of adults and nymphs of *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Blattellidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and assessment of delivery strategies. Neotrop. Entomol. 40: 368–374.
- Maketon M., Hominchan A. and H. Dararat. 2010. Control of American cockroach (*Periplaneta americana*) and German cockroach (*Blattella germanica*) by entomopathogenic nematodes. Rev. Colom. de Entomol. 36 (2): 249-253.
- Manweiler, S., Appel, A. and Weber, T. 1993. Nematode-based biological control of German cockroaches. In “Proceedings of the 1st International Conference on Insect Pests in Urban Environments”, pp. 173–180.
- Mariconi, F.A.M. As baratas. 1999. In: Mariconi, F.A.M. (Ed). Insetos Invasores de residências. Piracicaba: FEALQ. v.6, p. 13-33.
- McCanless. (2011). Oriental Cockroach, *Blatta orientalis* Linnaeus (Insecta: Blattodea: Blattidae). Document nº EENY-159 (IN316). Department of Entomology and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu>.

- McConnell R, Milam J, Richardson J, Galvan J, Jones C, Thorne PS, *et al.* (2005). Educational intervention to control cockroach allergen exposure in the homes of Hispanic children in Los Angeles: results of the La Casa study. *Clin Exp Allergy*. 35:426–433.
- Milner R.J., Pereira M.R: (2007). Microbial control of urban pest – cockroaches, ants, and termites. In: *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* L.A. Lacey and H.K. Kaya (eds.).695–711.
- Mindykowski B, Jaenicke E, Tenzer S, Cirak S, Schweikardt T, Schild H, Decker H. (2010). Cockroach allergens Per a 3 are oligomers *Dev. Comp. Immunol.* 34 (2010) 722–733.
- Ministerio de Salud de la Nación. 2006. Diagnóstico sobre el uso y manejo de plaguicidas de uso doméstico. Estudio colaborativo multicéntrico. Resolución MSyA N° 393/05.
- Mukha, D.V., Chumachenko A.G., Dykstra M.J., Kurtti T.J., and Schal C. (2006). Characterization of a new densovirus infecting the German cockroach, *Blattella germanica*. *J. Gen. Virol.* 87, 1567–1575.
- Mullins D.E. and Cochran D.G. (1987). Nutritional ecology of cockroaches. In *Nutritional Ecology of Insects, Mites, Spiders, and Related Invertebrates* (ed. F. Slansky, Jr and J. G. Rodriguez), pp. 885-902. New York: John Wiley & Sons.
- Navon A. & Ascher K.R.S. (2000). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes* CABI Publishing Oxon, UK.324 pp.
- Nguyen K.B., Smart G.C.Jr. (1996). Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Steinernematidae) for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control. *J. Nematol.* 28 (3): 286-300.
- Nigam L.N. (1933). The life history of a common cockroach (*Periplaneta americana* L.). *Ind. J. Agri. Sci.* 3: 530-543.
- Nowak-Wegrzyn A.H., Bencharitiwong R., Schwarz J., David G., Eggleston P., Gergen P., Liu, A., Pongracic J., Sarpong S. and Sampson H. (2009). Mediator release assay for assessment of biological potency of German cockroach allergen extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 949-955.

- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM. (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89 (7):2699–2702.
- Undeen A.H. & Vavra J. (1997). Research methods for entomopathogenic Protozoa. En Lacey L. (ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. Chapter IV. Pp. 117-151.
- Pai H.H., Chen W.C. & Peng C.F. (2005). Isolation of bacteria with antibiotic resistance from household cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*). *Acta Trop*. 93, 259 265.
- Papierok B. and Hajek A.E. (1997). Fungi: Entomophthorales. In: L. *Manual of techniques in insect pathology*”, Lacey (ed.). Chapter V-2. Pp 187-212.
- Peggy K., Powell PK, Robinson WH. (1980). Descriptions and key to the first instar nymphs of five *Periplaneta* species (Dictyoptera: Blattidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 82:212–28.
- Perrot R.C., Miller D.M. (2010). American Cockroach. Note number 444-288. Produced by Communications and Marketing, College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Porcar M., Navarro L., and R. Jimenez-Peydro. (2006). Pathogenicity of intrathoracically administrated *Bacillus thuringiensis* spores in *Blatta orientalis*. *J. Invertebr. Pathol.* 93:63-66.
- Qian K, Wei X, Zeng X, Liu T, Gao X. (2010). Stage-dependent tolerance of the German cockroach, *Blattella germanica* for dichlorvos and propoxur. *J Insect Sci.*;10:201.
- Quesada-Moraga E., Yuen R., Valverde-García P. and Santiago-Alvarez C. (2004). Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). *J. Invertebr. Pathol.* 87: 51–58.
- Radek R., Fabel P. (2000). A new entomopoxvirus from a cockroach: light and electron microscopy. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 19–27
- Radek R, Herth W. 1999. Ultrastructural investigation of the spore forming protest *Nephridiophaga blattellae* in the Malpighian tubules of the German cockroach *Blattella germanica*. *Parasitol Res.* 85(3):216-31.

- Ramírez Pérez J. (1989). La cucaracha como vector de agentes patógenos. Bol Of Sanit Panam. 107(1):41-53.
- Reierson D.A., Rust M.K. and Paine E. (2005). Control of American cockroaches (dictyoptera: blattidae) in sewer systems. Proceedings of the Fifth International Conference on Urban Pests Chow-Yang Lee and William H. Robinson (ed.), Malaysia.
- Richards A.G., Smith M.N. (1956). Infection of cockroaches with *Herpomyces* (Laboulbeniales). II. Histology and hystopathology. Ann. Entomol. Soc. Am. 49, 85–93.
- Ross M.H. (1993). Laboratory studies on the response of German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) to an abamectin gel bait. J. Econ. Entomol. 86: 767:771.
- Ross M.H. (1998). Response of behaviorally resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) to the active ingredients in a commercial bait. J. Econ. Entomol. 91: 150:152.
- Roth L.M & Willis E.R. (1954). The reproduction of cockroaches. Smithson. Misc. Coll. 1221-49.
- Roth L.M. & Willis E.R. (1956). Parthenogenesis in cockroaches. Ann. Entomol.Soc. Amer. 49: 195-204.
- Roth L.M. & Willis E.R. (1960). The biotic associations of cockroaches.Smithson. Misc. Coll. 141, 1–470.
- Sacchi L.; Corona S.; Grigolo A.; Laudani U.; Selmi M. G.; Bigliardi E. (2012). The fate of the endocytobionts of *Blattella germanica* (Blattaria: Blattellidae) and *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae) during embryo development. Ital. J. Zool. 63. 1-11.
- Sacchi L., Grigolo A. (1989). Endocytobiosis in *Blattella germanica* L. (Blattodea): recent acquisitions. Endocyt. Cell Res. 6: 121-147.
- Santamaría S. (2003). Laboulbeniales, II. Acompsoomyces. Ilyomyces. Flora Mycologica Iberica 5: 1-344. (Acompsoomyces, Ilyomyces, Flora, Tax).
- Schal C. & Hamilton R.L. (1990). Integrated Suppression of Synanthropic Cockroaches. Ann. Rev. Entomol. 35:521-55.

- Scharf M. and Bennett G. (1995). Cockroach resistance IPM: a common sense approach. *Pest Control*.38:41.
- Silverman J. & Bieman D. N. (1993). Glucose aversion in the German cockroach, *Blattella germanica*. *J. Insect Physiol.* 39: 925:933.
- Silverman J. & Ross M. H. (1994). Behavioral resistance of field-collected German cockroaches (Blattodea: Blattellidae) to baits containing glucose. *Environ. Entomol.* 23: 425:430.
- Smith L.M. II., Appel A.G., Mack T.P., Keever G.J., Benson E.P. (1995). Comparative effectiveness of an integrated pest management system and an insecticidal perimeter spray for control of smokybrown cockroaches (Dictyoptera: Blattidae). *J. Econ Entomol.*88:907–17.
- Smith L.M. II., Appel A.G., Mack T.P., Keever G.J., Benson E.P. (1997). Evaluation of methods of insecticide application for control of smokybrown cockroaches (Dictyoptera: Blattidae). *J. Econ. Entomol.* 90:1232–42.
- Solter L.F., Becnel J.J. & Vávra J. (2012). Research methods for entomopathogenic microsporidia and other protists. In: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Lacey L. (eds). Chapter XI. Pp. 329-367.
- Suiter D.R. (1997). Biological suppression of synanthropic cockroaches. *J. Agric. Entomol.* vol 14. Nro 3: 259-270.
- Suiter D.R. & Koehler P.G. (2003a). The American Cockroach, *Periplaneta americana*. Document N° ENY232, one of a series of the Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Suiter D.R. & Koehler P.G. (2003b) Oriental Cockroach, *Blatta orientalis*.. ENY239.Department of Entomology and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Suiter D.R. & Koehler P.G. (2003c). The Smokybrown Cockroach, *Periplaneta fuliginosa*. ENY240. Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension

Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
<http://edis.ifas.ufl.edu>

Sun X. (2015). History and Current Status of Development and Use of Viral Insecticides in China.(Review). *Viruses*.7, 306-319.

Suto C., Kawamoto F. and Kumada N. (1979). A new virus isolated from the cockroach, *Periplaneta fuliginosa* (Serville), *Microbiol. Immunol.* 23; 207-211.

Taiariol D.R., Vassena C.V., Picollo MI, Alzogaray RA, Zerba E.N. (2001). Resistencia a insecticidas en *Blattella germanica* de Buenos Aires. *Acta Toxicol. Argent.* vol. 9 p. 92 - 92.

Tanada Y. & Kaya H.K. (1993). *Insect Pathology*. New York: Academic Press. San Diego, pp 666.

Thiery I. & Frachon E. (1997). Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. En “Manual of techniques in insect pathology”. Lacey L. (ed.), Chapter III-1. Pp. 55-77.

Townes H. (1949). The nearctic species of *Evaniidae*. *Proc. U.S. Natl. Museum.*, 99, 525-539.

Tsuji H. (1975). Development of the smokybrown cockroach, *Periplaneta fuliginosa*, in relation to resistance to cold. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 26:1-6

Undeen A.H. & Vavra J. (1997). Research methods for entomopathogenic Protozoa. En Lacey L. (ed.) *Manual of techniques in insect pathology*. Chapter IV. Pp. 117-151.

Vaishampayan P.A., Dhotre D.P., Gupta R.P., Lalwani P., Ghate H.; Patole M. S.; Shouche Y. S. (2007). Molecular evidence and phylogenetic affiliations of *Wolbachia* in cockroaches. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44:1346-1351.

Valles S. (2014). German Cockroach, *Blattella germanica* (Linnaeus) (Insecta: Blattodea: Blattellidae). EENY-002 (IN128). Published by Department of Entomology and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures>. p 1-4.

- Van Lenteren J.C. (2000). Success in biological of arthropods by augmentation of natural enemies. En: Gurr G. y Wratten S. (Eds.). Biological control: measures of success. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherland. pp.77-103.
- Wang, C., Abou El-Nour M.M., Bennett, G.W. (2008). Survey of Pest Infestation, Asthma, and Allergy in Low-income Housing. *J Community Health*. 33: 31–39.
- Wang C. & Bennett G. W. 2006. Comparative Study of Integrated Pest Management and Baiting for German Cockroach Management in Public Housing. *J. Econ. Entomol.* 99, 879-885.
- Wang, C. & Bennett G.W. (2009). Cost and Effectiveness of Community-Wide Integrated Pest Management for German Cockroach, Cockroach Allergen, and Insecticide Use Reduction in Low-Income Housing. *J. Econ. Entomol.* 102(4): 1614:1623
- Wang C. & Bennett G.W. (2010). Least toxic strategies for managing German cockroaches. In C. Peterson and D. Stout II (eds.). *Pesticides in Household, Structural and Residential Pest Management*. American Chemical Society. pp. 125-141.
- Wang C., Scharf M.E., Bennett G.W. (2004). Behavioral and physiological resistance of the German cockroach to gel baits (Blattodea: Blattellidae). *J Econ Entomol.* 97(6):2067-72.
- Wang D., Wang Y.M., Wei C.X., Zhang Z., Zheng X. (2012). Review of environmental-friendly public health insecticides (in Chinese). *Chin. J. Vector Biol. Control*. 23, 485–488.
- Werren J.H., Zhang W. and Guo L.R.. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*-reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 261: 55-63.
- Wilen C.A., Haver D.L., Flint M.L., Davis P.M. y Unruh C.L. (2008). *Pesticidas: uso seguro y eficaz en el hogar y en jardines*. Publicación 74138. Produced by University of California Statewide IPM Program.
- Williams, B. A. P., Dolgikh, V. V. and Sokolova, Y. Y. (2014) *Microsporidian Biochemistry and Physiology*, in *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, First Edition (eds L. M. Weiss and J. J. Becnel), John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.

- Willis E.R., Riser G.R. and Roth L.M. (1958). Observations on reproduction and development in cockroaches. *Ann Entomol. Soc. Amer.* 51: 53-69.
- Wu H., Appel A.G. and Ping Hu X. (2013). Instar Determination of *Blaptica dubia* (Blattodea: Blaberidae) Using Gaussian Mixture Models. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106(3): 323-328.
- Wylezich C., Radek R. and Schlegel M. (2004). Phylogenetic analysis of the 18S rRNA identifies the parasitic Protist *Nephridiophaga blattellae* (Nephridiophagidae) as a representative of the Zygomycota (Fungi). *Denisia*, 13, 435:442.
- Zervos S., Webster J.M. (1989). Susceptibility of the cockroach *Periplaneta americana* to *Heterorhabditis heliothis* (Nematoda: Rhabditoidea) in the laboratory. *Can. J. Zool.* 67, 1609–1616.
- Zurek L., D. WesWatson, and Schal C. (2002). Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and boric acid against the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Biol. Control.* 23: 296–302.
- Zhou W., Rousset F., and O'Neill S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings B.*

**CAPÍTULO II: PROCESAMIENTO E
IDENTIFICACIÓN DE PROTISTAS
PARÁSITOS DE CUCARACHAS.**



INTRODUCCIÓN

Las gregarinas se incluyen dentro del Phylum Apicomplexa Levine; Sub Clase Gregarinasina Dufour; Orden Eugregarinoidea, Léger. Las eugregarinas son Protistas del tracto digestivo o hemocèle de artrópodos y otros invertebrados. Poseen trofozoítos maduros extracelulares grandes y no presentan una fase asexual o merogónica en su ciclo de vida. Liberan sus esporozoítos infectivos mediante esporas (ooquistes) al ser ingeridos por un hospedador susceptible (Lange, 1996). Tienen locomoción progresiva por deslizamiento u ondulación de crestas longitudinales, o no progresiva (Clopton, 2009). Las gregarinas que parasitan a las cucarachas pertenecen al suborden Septatorina Lankester. Este suborden se caracteriza por presentar gamontes con un septo o tabique que dividen el cuerpo en un protomerito anterior y deuteromerito posterior. Los trofozoítos jóvenes poseen además un epimerito anterior (Levine, 1988; Clopton, 2009). Este suborden contiene 1.166 especies citadas que constituyen 151 géneros. El tabique que presentan las gregarinas septadas las distinguen de las gregarinas no septadas (Aseptatorina). En su ciclo de vida las gregarinas son diseminadas en las poblaciones de cucarachas mediante transmisión horizontal, es decir, de individuo a individuo por ingestión de la forma infectiva del parásito (Villanueva, 2004). Una vez que los ooquistes se ubican en el intestino del hospedador, los esporozoítos escapan del ooquiste y migran hacia el epitelio intestinal donde permanecen adheridos a éste por el epimerito, absorbiendo sustancias nutritivas por contacto directo. Crecen hacia el lumen intestinal y se llaman trofozoítos. Los trofozoítos maduros se desprenden del epitelio intestinal del hospedador, pierden el epimerito y se transforman en formas libres o gamontes (Clopton, 1995). Estos individuos maduros son en realidad las formas sexuales (haploides). Dos gamontes de sexo opuesto se atraen entre sí y se unen de extremo a extremo en el complicado proceso conocido como sisigia, donde el primer gamonte se denomina primito y el segundo satélite. Los gamontes se conjugan (= conjugación), uniéndose entre sí a lo largo del eje del cuerpo y secretan un quiste sobre sí mismos para formar el gametoquiste. El núcleo de cada gamonte sufre repetidas divisiones formando muchos pequeños núcleos dispersos por todo el citoplasma. Cada núcleo migra a la superficie de la masa de citoplasma para formar gametos por un proceso llamado gametogonia (= gamogonia) (Olsen, 1986). Se produce la fertilización, con la formación del cigoto. Este proceso ocurre en el gametoquiste fuera del hospedador. En cada cigoto se forma una envoltura protectora llamada ooquiste que

sufre divisiones llamadas esporogonia, produciendo 8 esporozoítos por ooquiste. El gametoquiste es dehiscente en la madurez y libera los ooquistes infecciosos en el medio ambiente. Éstos son infectivos para las cucarachas que al ingerirlos inician un nuevo ciclo (Clopton, 1995; Villanueva 2004). Las eugregarinas encontradas en Blattodeos, son típicamente comensales intestinales (Maddox, 1987; Branco, 1998) o parásitos relativamente inocuos para el hospedador (Brooks, 1988). Cuando se trata de infecciones en insectos sometidos a condiciones de estrés, hay una disminución de la actividad, vigor (efecto de debilitamiento) y longevidad. Las repetidas infecciones provocan la acumulación de masas de trofozoítos en el lumen intestinal, ocasionando obstrucciones que impiden el libre flujo del alimento y pueden llevar a la muerte prematura de los insectos hospedantes (Zuk, 1987; Brook & Jackson, 1990; Lange, 1996). Debido a lo mencionado anteriormente, el control de las infecciones de gregarinas se vuelve particularmente importante en insectos criados en el laboratorio. Lopes y Alves (2005) obtuvieron que las cucarachas *B. germanica* infectadas con gregarinas fueron más susceptibles a la infección del hongo *M. anisopliae* que las cucarachas tratadas con Trifumuron, ya que este eliminaba las gregarinas del intestino del hospedador. Randall *et al.* (2013) han demostrado que *B. germanica* parasitada con *G. blattarum* padecían una reducción en los lípidos totales (37-68,8%), especialmente de los triacilgliceroles y los lípidos polares. Esto ocasionó una reducción en los lípidos relacionados con el sexo y con el estado reproductivo de la cucaracha, siendo estos resultados comparables con los obtenidos de las cucarachas sometidas a inanición. Aún faltan estudios más exhaustivos para determinar la relación parásito-hospedador.

En la República Argentina, las citas de eugregarinas sobre insectos son escasas (Luna 1981; Lange & Cigliano, 2004; Dellapé *et al.*, 2005) y no existen referencias previas de las especies de gregarinas presentes en cucarachas.

OBJETIVO

Contribuir a ampliar el conocimiento de las especies de gregarinas presentes en cucarachas en la Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cucarachas fueron disecadas como se describió en el capítulo I (p. 46). El tubo digestivo del insecto fue retirado y colocado en una caja de Petri con solución

salina (0,85% Cl Na) o fisiológica. Fue realizada una incisión longitudinal en el intestino medio y divertículos, se confeccionaron preparados en fresco con las gregarinas vivas montadas con solución salina. Se examinaron bajo el microscopio con contraste de fase y con campo claro para observar trofozoítos y gamontes libres o en asociación. Tomando las medidas correspondientes a cada género.

Para obtener los trofozoítos se tomó una porción del intestino con una pinza o aguja y se realizó un extendido en fresco, con solución fisiológica, para que se desprendan los trofozoítos que están fijos al intestino. En este estadio inmaduro se debe describir la morfología del epimerito, del protomerito y del deuteromerito (Fig. 1).

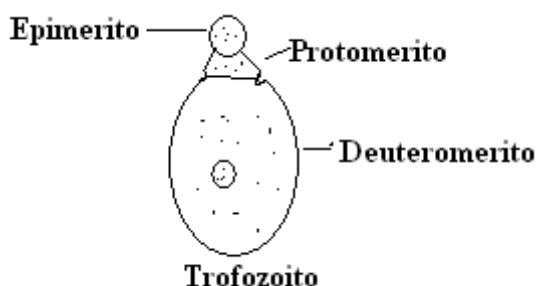


Figura 1. Esquema de un trofozoíto.

En el caso de los gamontes, tanto libres (Fig. 2a) como en asociación (Fig. 2b), se realizaron las descripciones y las medidas según correspondan a cada género y especie.

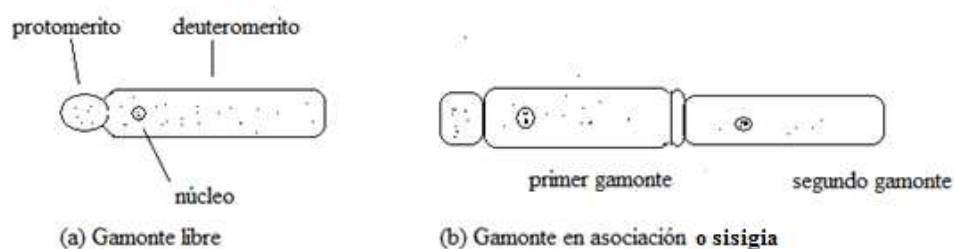


Figura 2. Gamontes libres y en asociación.

Se describió la forma y medidas de los gametoquistes y los ooquistes. Para obtener gametoquistes, se separaron las cucarachas en frascos individuales, y se recogieron las heces frescas. Bajo un microscopio binocular estereoscópico se observaron las heces en una caja de Petri, donde se separaron y fragmentaron con una aguja de disección. Con un pincel fino se recogieron los gametoquistes. Una vez recogidos, los gametoquistes, fueron lavados tres veces con una pipeta con solución

salina (0,85% Cl Na) o agua destilada, para retirar los restos de heces. Cada gametoquiste fue colocado individualmente sobre un cubreobjetos dentro de una caja de Petri excavada. Dicha caja, presenta en su margen interior un papel de filtro que fue humedecido con agua destilada para aumentar la humedad. Los quistes fueron incubados a 25 °C y fueron controlados diariamente, registrando el tiempo que tardaron en emerger los ooquistes. Los gametoquistes también se pueden recoger desde el recto de las cucarachas al diseccionarlas. Las cadenas de ooquistes fueron tomadas con una aguja y colocadas en un portaobjetos con solución salina y cubiertos con un cubreobjetos (preparados en fresco), cada ooquiste se midió bajo el microscopio óptico con contraste de fases.

Las medidas fueron tomadas usando un microscopio óptico Olympus Bx41 con cámara incorporada Lumenera Infinity 1 y se utilizó para el análisis de las imágenes capturadas el software libre IMAGE J. Las mediciones se expresaron en micrómetros (μm), estableciéndose la media y la desviación estándar, con los valores máximos y mínimos y el tamaño de la muestra entre paréntesis. La terminología para la anatomía y las etapas ontogenéticas del parásito siguen el trabajo de Levine (1971). La terminología que enumera las diferentes formas y planos fue definida por Clopton (2004).

Otro tipo de preparado que se realizó fue colocar una gota de solución salina con gregarinas sobre un portaobjeto y se dejó secar, este portaobjetos se introdujo en un frasco con AFA (ver Anexo) para fijar las gregarinas y luego colorearlas. La coloración se realizó con Semichon ácido carmín (ver Anexo).

Para los estudios histopatológicos se realizaron cortes histológicos como se describe:

Las cucarachas fueron sedadas y disecadas según fue indicado en el capítulo I (p. 45). Los tejidos y órganos se fijaron en AFA (ver Anexo) durante 48 horas, luego se pasaron a alcohol 70° donde se mantuvieron hasta la realización de los cortes histológicos. Todos los cortes fueron montados en parafina y seccionados en forma seriada con micrótopo manual (Reichert), efectuándose cortes sagitales de 5-6 μm de espesor. Por último los cortes fueron coloreados utilizando coloración de hematoxilina-eosina (ver Anexo), donde los núcleos se colorearon de azul, azul morado o violeta, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron, y el citoplasma y material extracelular utilizando la eosina que les confiere diversos grados de color

rosado. Los mismos fueron observados bajo microscopio óptico Olympus Bx41 con cámara incorporada Lumenera Infinity 1, y luego de ser estudiados, depositados en la colección de cortes histológicos del laboratorio de hongos entomopatógenos del CEPAVE, con su correspondiente número de identificación (3164; 3165).

La prevalencia del parásito fue calculada según Bush *et al.* (1997) como el número de hospedadores infectados por una especie parásita particular, dividido por el número de total de hospedadores examinados; se expresó en porcentaje.

Superfamilia Gregarinoidea Chakaravarty, 1960 Emend. Clopton, 2009 (= Gregarinicae Chakaravarty, 1960).

Características: Asociación presigial (trófica o gamontica); caudofrontal; gametoquistes con epiquiste hialino, dehiscencia por extrusión a través de esporoductos; ooquistes liberados en cadenas. Esta superfamilia contiene 7 familias con 45 géneros y 561 especies nombradas

Familia Blabericolidae Clopton, 2009

Es un clado monofilético, que incluye dos géneros *Blabericola* y *Protomagalhaensia* (Clopton, 2009). Gamontes con asociación caudo-frontal. Esta familia contiene 2 géneros y todos son parásitos de cucarachas.

La forma y la estructuras de los trofozoítos maduros, sobre todo la del epimerito, comprenden un importante carácter diagnóstico, aunque la forma y las proporciones relativas son útiles en el diagnóstico, existe una variación significativa en el desarrollo dentro de los taxones que se opone a la utilización de las medidas tomadas de los trofozoítos (Filipponi, 1951; Watwood *et al.*, 1997; Clopton, 1999). Las descripciones separadas de los estados ontogénicos del primito y satélite son provistas para tener en cuenta el dimorfismo sexual observado en estos grupos (Filipponi, 1955; Clopton, 2006, 2011). Los caracteres morfométricos fueron delineados por Clopton y Hays (2006), para caracterizar los géneros *Protomagalhaensia* y *Blabericola* se utilizaron los trabajos de Clopton (2010, 2011, 2012a, 2012b). A continuación, se detallan los caracteres métricos y abreviaturas (Fig. 3): largo deldeuteromerito (DL), distancia desde el septo que separa el protomerito del deuteromerito al eje que marca el ancho máximo del deuteromerito (DLAM), distancia desde la región posterior del deuteromerito a el eje

que marca el ancho máximo del deutomerito (DLPM), ancho del deutomerito en el eje ecuatorial (DWE), ancho máxima del deutomerito (DWM), (GW) ancho del gametoquiste, (GL) longitud del gametoquiste, diámetro del cariosoma mayor (KD), distancia del núcleo al septo que separa el protomerito del deutomerito (NDS), longitud del núcleo (NL), ancho del núcleo (NW), longitud del ooquistes (OL), ancho del ooquiste (OW), ancho del septo entre el protomerito y deutomerito (PDSW), largo del protomerito (PL), distancia del extremo anterior del protomerito al eje que marca el ancho máximo del protomerito (PLAM), distancia del septo que separa el protomerito-deutomerito al eje que marca el ancho máximo del protomerito (PLPM), longitud total del primer gamonte (primito) que se encuentra en sisigia (PTL), ancho del protomerito en el eje ecuatorial (PWE), ancho máximo del protomerito (PWM), longitud total del segundo gamonte (satélite) que se encuentra en sisigia (STL).

Para las medidas del género *Blabericola* se agregó el ancho del septo que une el primito y el satélite (PSSW) (Fig. 3a). Para las medidas del género *Protomagalhaensia* se agregó el espesor del acetábulo del satélite (AcD), ancho a nivel del acetábulo del satélite (AcW) (Fig. 3b y c).

Género *Blabericola* Clopton, 2009

Este es un género erigido por metodologías basadas en características moleculares (Clopton, 2009), que incluye hasta ahora cinco especies de las cuales tres especies cambiaron de género a *Blabericola migrator*, *B. haasi* y *B. cubensis* (= *Leidyana migrator*, *L. haasi*, y *Gregarina cubensis*). Están caracterizados por tener un epimerito simple, globular a piriforme, sin diamerito; el deutomerito del gamonte con forma obpanduriforme; gamontes en asociación, presisigial, caudofrontal; gametoquistes con extrusión de las cadenas de ooquistes a través de esporoductos; la forma de los ooquistes es desde elipsoide a dolioforme (forma de barril); parásitos de cucarachas gigantes o blabéridos (Familia Blaberidae).

Género *Protomagalhaensia* Pinto, 1918 Clopton, 2009

La forma del epimerito del trofozoíto es de ovoide a deltoide, se desarrollan intracelularmente dentro de una única célula epitelial intestinal del hospedador, no

retenido en gamontes; los trofozoítos se alargan en la madurez; los gamontes con asociación caudofrontal, esta asociación es una interconexión superficial semiobpanduriforme en la que el extremo posterior del deutomerito del primer gamonte está envuelto y sujeto por un acetábulo formado por la membrana anterior del protomerito del satélite o segundo gamonte (Fig. 3 b,c); la forma de los ooquistes es dolioforme, con o sin espinas o con un ápice terminal prominente o redondeado, y se desprenden en cadenas desde el gametocistes por rotura simple. Hay 6 especies descriptas.

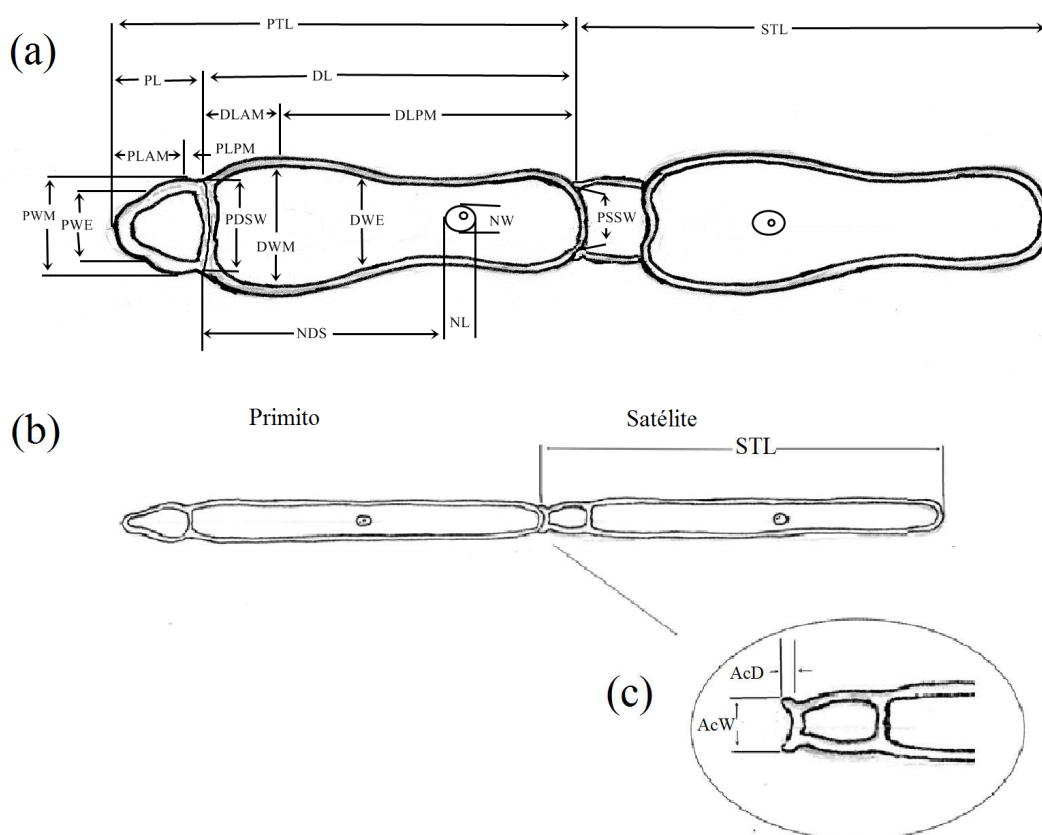


Figura 3. (a) Esquema de los caracteres morfométricos de los gamontes en asociación del género *Blabericola*. (b) Esquema de los gamontes en asociación del género *Protomagalhaensia*. (c) detalle del acetábulo del satélite del género *Protomagalhaensia*.

Familia Gregarinidae Labbé, 1899

Epimerito sencillo; desarrollo intracelular temprano; asociación caudofrontal, generalmente temprana, incluso muy precoz; anisogamia moderadamente marcada;

gametoquistes con esporoductos; ooquistes alargados o cilíndricos, simétricos. Esta familia contiene 15 géneros y 352 especies, principalmente parásitos intestinales de insectos.

Los caracteres morfométricos fueron delineado por Clopton y Hays (2006), Clopton (2008). A continuación, se detallan los caracteres métricos y abreviaturas (Fig. 3a): ancho del septo que une el primito con el satélite (AscSW); largo del deuteromerito (DL); distancia desde el septo que separa el protomerito del deuteromerito al eje que marca el ancho máximo del deuteromerito (DLAM); distancia desde la región posterior del deuteromerito a el eje que marca el ancho máximo del deuteromerito (DLPM); ancho del deuteromerito en el eje ecuatorial (DWE); ancho máxima del deuteromerito (DWM); ancho del gametoquiste (GW); longitud del gametoquiste (GL); distancia del núcleo al septo que separa el protomerito del deuteromerito (NDS); longitud del núcleo (NL); ancho del núcleo (NW); longitud del ooquistes interior (OLI); longitud máxima de ooquistes exterior (OLM); ancho máximo exterior del ooquiste (OWM); ancho exterior del extremo terminal del ooquiste (OWTE); ancho interior de la región terminal del ooquiste (OWTI); ancho del septo que une el protomerito y el deuteromerito (PDSW); largo del protomerito (PL); distancia del extremo anterior del protomerito al eje que marca el ancho máximo del protomerito (PLAM); distancia del septo que separa el protomerite-deutomerite al eje que marca el ancho máximo del protomerito (PLPM); primito (Pr); longitud total del primer gamonte (primito) que se encuentra en sisigia (PTL); ancho del protomerito en el eje ecuatorial (PWE); ancho máximo del protomerito (PWM); ancho del protomerito en el extremo terminal (PWT); satélite (Sat); longitud total del segundo gamonte (satélite) que se encuentra en sisigia (STL).

Genero Gregarina Dufour, 1828 (= *Degiustia* Levine, 1979 [in part]) (= *Erhardovina* Levine, 1985 [in part])

Asociación temprana; caudofrontal; epimerito cónico, en forma de botón, globular, o cilíndrico. Ooquistes doliformes o en forma de barril, navicular o esféricos; gametoquistes dehiscentes en largas cadenas de varios esporoductos. Se ubican en el intestino de los insectos.

RESULTADOS

Se analizaron dos poblaciones diferentes de *B. dubia* o cucaracha argentina, una población silvestre muestreada en la ciudad de Tandil (Capítulo I) y otra población mantenida en cría artificial para alimentar reptiles ubicada en la ciudad de La Plata. Ambas poblaciones estaban parasitadas con dos gregarinas, es decir, presentaron doble infección. Estas gregarinas se encontraban parasitando el intestino medio y ciegos gástricos. Se identificaron dos géneros uno fue identificado como *Blabericola* (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae) y el otro *Protomagalhaensia* (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae). A través del muestreo realizado en la ciudad de La Plata se analizó el intestino medio de la cucaracha *P. fuliginosa* y se determinó la presencia de *Gregarina* sp..

Superfamilia Gregarinoidea Chakaravarty, 1960 Emend. Clopton, 2009 (= Gregarinicae Chakaravarty, 1960).

Familia Blabericolidae Clopton, 2009

Género Blabericola Clopton, 2009

Blabericola sp.:

Gamontes en asociación: las mediciones fueron tomadas de gamontes maduros en asociación. Asociación caudoforontal con gamontes anisomorficos, debido a las estructuras implicadas en la unión de la sisigia, el punto de contacto de la asociación era una unión superficial, donde el extremo posterior del deuteromerito del primito esta incrustado de manera poco profunda en las membranas anteriores del protomerito del satélite (fig. 4). Índices: PTL/STL $1,1 \pm 0,1$ (0,8–1,3); PPWM/SPWM $1 \pm 0,1$ (0,8–1,3), PDL/SDL $1 \pm 0,1$ (0,7– 1,3); PDWM/SDWM $1,1 \pm 0,1$ (0,9–1,4), PDWE/SDWE $1 \pm 0,2$ (0,8–1,5).

-Primito o primer gamonte: epimerito ausente; el protomerito de tamaño y forma variable, variando desde finamente deltoides en algunos casos con el extremo anterior finamente ovoide, hasta piriforme destacando en el extremo anterior una papila

protuberante (Fig. 4 a, b y c). Medidas: PL $72,9 \pm 12,8$ (41,2-101,8; 30); PWE $57,3 \pm 11,5$ (38,1,3 – 87,1; 30); PWM $66,6 \pm 8,8$ (48 – 89,3; 30), PLAM $54,4 \pm 12,1$ (33,5-80,9; 30); PLPM $16,8 \pm 6,2$ (5,6- 32,7; 30); PDS W $65 \pm 8,1$ (49,8 – 77,9; 30); PL/PWE $1,3 \pm 0,4$ (0,5- 2,1; 30); PL/PWM $1,1 \pm 0,3$ (0,5- 1,6; 30); PL/PDSW $1,1 \pm 0,2$ (0,5- 0,9; 30); PLAM/PL $0,7 \pm 0,1$ (0,5- 0,9; 30); PLAM/PLPM $3,7 \pm 1,7$ (1,2 – 9,8; 30); PWM/PWE $1,2 \pm 0,1$ (1 – 1,4; 30). Deuteromerito generalmente obpanduriforme predominando el eje vertical, con los márgenes estrechos (Fig. 4 b), convirtiéndose a elipsoide comprimido (Fig. 4 a). Medidas: DL $343,9 \pm 55,3$ (241–474,5; 30); DWE $85,5 \pm 20,9$ (47,7 – 132,4; 30); DWM $102,1 \pm 21,4$ (55,6- 152,7; 30); DLAM $79,6 \pm 51,3$ (39,5 – 331,7 ; 30); DLPM $259,8 \pm 69,9$ (54,1- 414; 30); DL/DWE $4,2 \pm 1,1$ (2,1-6,4 ; 30); DL/DWM $3,5 \pm 0,8$ (2 – 5,1; 30); DLAM/DL $0,2 \pm 0,1$ (0,1- 0,9; 30); DLAM/DLPM $0,5 \pm 1,1$ (0,1-6,1; 30); DWM/DWE $1,2 \pm 0,1$ (1 – 1,4; 30); PTL $416,8 \pm 62$ (311-554,4);. *Indices*: PTL/PL $5,8 \pm 0,9$ (4,4- 8,2; 30); PTL/PWM $6,3 \pm 1,1$ (3,9-8,7; 30); PTL/PWE $7,6 \pm 1,9$ (4,2- 12,3; 30); DL/PL $4,8 \pm 0,9$ (3,4 – 7,2; 30); PTL/DL $1,2 \pm 0,04$ (1,1- 1,3; 30); PTL/DWM $4,2 \pm 0,9$ (2,3- 6,2; 30); PTL/DWE $5,1 \pm 1,3$ (2,4-7,8; 30); DWM/PWM $1,5 \pm 0,3$ (1,1 – 2,4; 30); PDWE/PWE $1,5 \pm 0,2$ (1,2 – 2,3; 30). Núcleo: orbicular, ubicado en la mayoría de los casos en el tercio anterior (Fig. 4c) .NL $22,9 \pm 5$ (16,3-34,2; 30); NW $23,4 \pm 4,3$ (13,2 – 29; 30); NDS $64,5 \pm 25,1$ (20,6 – 102,4; 30); NL/NW $1 \pm 0,2$ (0,7 – 1,3; 30); NDS/NL $2,9 \pm 1,4$ (1,1- 6,3; 42); DL/NDS $6,4 \pm 8,8$ (2,4 – 17,2; 30).

- Satélite o segundo gamonte: el protomerito se observó comprimido anteriormente por la union de la sisigia y las membranas anteriores formaban un margen toroidal en la unión al deuteromerito del primito (Fig. 4 a, d), el protomerito era de forma oblonga a cuadrada y el septo que une el protomerito y el deuteromerito varió de recto a levemente cóncavo y hay poca o ninguna constricción (Fig. 4 a, d y c). Medidas: PSSW $51,2 \pm 6,3$ (36,3 – 62,9; 30); PL $49,1 \pm 7,8$ (31,6 – 63,4; 30); PWE $56,2 \pm 11,2$ (30,9 - 76,6; 30); PWM $65,3 \pm 9,7$ (41,3-83,1; 30); PLAM $33,6 \pm 7,1$ (17,6 – 44; 30); PLPM $14,1 \pm 6,3$ (6,6-40; 30); PDSW $62,6 \pm 13,2$ (19,8- 84,4 ; 30); PL/PWE $0,8 \pm 0,2$ (0,5-1,2; 30); PL/PWM $0,8 \pm 0,2$ (0,5- 1,2; 30); PL/PDSW $0,8 \pm 0,3$ (0,5 – 2,2; 30); PLAM/PL $0,7 \pm 0,1$ (0,3-0,9; 30); PLAM/PLPM $2,8 \pm 1,2$ (0,4 -5,9; 30); PWM/PWE $1,2 \pm 0,1$ (1-1,4; 30). El Deuteromerito tiene forma alargada levemente obpanduriforme a elipsoide, con el extremo anterior recto o levemente cóncavo (Fig. 4 a, d y c). Medidas: DL $339,6 \pm 67$ (227,5-522,9; 30); DWE $81,6 \pm 15,6$ (45,6 – 109,4; 30); DWM $93 \pm 15,5$ (55,5 – 120,2;

30); DLAM $68,6 \pm 35$ (29,8-219,7; 30); DLPM $262,7 \pm 65,9$ (87,2 – 403,6; 30); DL/DWE $4,3 \pm 1,1$ (2,5 – 6,9; 30); DL/DWM $3,7 \pm 0,9$ (2,4 – 6,5; 30); DLAM/DL $0,2 \pm 0,1$ (0,1 – 0,7; 30); DLAM/DLPM $0,3 \pm 0,4$ (0,1 – 2,5; 30); DWM/DWE $1,1 \pm 0,1$ (1 – 1,3; 30); STL $388,7 \pm 67,2$ (270,8 – 560,7; 30). *Indices*: STL/PL $8,1 \pm 1,9$ (5,3 – 14,8; 30); STL/PWM $6 \pm 1,2$ (4 – 9,4; 30); STL/PWE $7,1 \pm 1,7$ (4,3 – 11,1; 30); DL/PL $7,1 \pm 1,9$ (4,3 – 13,8; 30); STL/DL $1,1 \pm 0,04$ (1,1 – 1,2; 30); STL/DWM $4,3 \pm 0,9$ (2,7 – 7; 30); STL/DWE $4,9 \pm 1,2$ (2,9 – 7,5; 30); DWM/PWM $1,4 \pm 0,14$ (1,2 – 1,7; 30); DWE/PWE $1,5 \pm 0,2$ (1,1 – 1,9; 30). Núcleo casi orbicular, ubicado en el tercio anterior (Fig. 4c). NL $24,3 \pm 4,3$ (18,3 – 32,8; 30); NW $22,1 \pm 2,7$ (17,7 – 26,6; 30); NDS $82,2 \pm 59,7$ (54,6 – 264,6; 30); NL/NW $1,1 \pm 0,2$ (0,9 – 1,5; 30); NDS/NL $3,5 \pm 2,8$ (1,1 – 12,8; 30); DL/NDS $6,2 \pm 4,3$ (1,4– 15,1; 30).

Gametoquistes (n=30): (Fig. 7 a) de color blanco opaco, forma elipsoide. Largo $374,7 \pm 21$ (348,1 – 400,7; 25); ancho $235,9 \pm 20,3$ (211,6-270,5); GL/GW $1,6 \pm 0,1$ (1,4 – 1,7). Los gametoquistes fueron recogidos de las heces e incubados bajo condiciones de humedad y temperatura controlada, se produjo la extrusión a través de esporoductos (Fig. 7 b), se contaron 12 tubos, con liberación de ooquistes en cadenas dentro las 24 - 48 horas (Fig. 7 c).

Ooquistes (n=30): (Fig. 7 c) de forma dolioformes, con los vértices redondeados. OL $6,79 \pm 0,2$ (6,4-7,2; 30); OW $4,1 \pm 0,17$ (3,9-4,4; 30); OL/OW= $1,6 \pm 0,07$ (1,5-1,7; 30).

Género Protomagalhaensia Pinto, 1918 sensu Clopton, 2009

Protomagalhaensia sp.:

Gamontes en asociación: las mediciones fueron tomadas de gamontes maduros en asociación. Asociación caudofrontal, con gamontes anisomorficos, debido a las estructuras involucradas en la sisigia. El punto de contacto de la asociación era superficialmente semiobpanduriform (Fig. 5 a, c y d) en la que el extremo posterior del deuteromerito del primito esta comprimido y sujeto por un acetábulo formado a partir de las membranas anteriores del protomerito del satélite, cada vez menos destacadas en la madurez (Fig. 5 a c y d). El epicito o capa externa del citoplasma era gruesa, principalmente en el extremo anterior del protomerito del *Primito* (Fig. 5 a, b ,e, f).

Indices: PTL/STL $1,09 \pm 0,07$ (0,92 - 1,25; 37); PPL/SPL $1,4 \pm 0,2$ (1-1,9; 37); PPWM/SPWM $1 \pm 0,1$ (0,7-1,4; 37); PDL/SDL $1,1 \pm 0,1$ (0,9-1,5; 37); PDWM/SDWM $1 \pm 0,1$ (0,7-1,3; 37); PDWE/SDWE $1 \pm 0,1$ (0,7-1,5; 37).

-Primito o primer gamonte: epimerito ausente; protomerito piriforme a deltoides (Fig. 5 b, e, f); Medidas: PL $79 \pm 16,6$ (47,8-112,4 ;37); PWE $39,9 \pm 8$ (26,5 – 60,5; 37); PWM $44,3 \pm 9$ (29,6 – 61,4; 37), PLAM $61,6 \pm 15,4$ (37,5- 95,7; 37); PLPM $17,5 \pm 7,9$ (6,5- 37,7; 37); PDSW $41,6 \pm 8,8$ (27,8 – 58,6; 37); PL/PWE $2 \pm 0,3$ (1,3- 2,6; 37); PL/PWM $1,8 \pm 0,3$ (1,2- 2,4; 37); PL/PDSW $1,9 \pm 0,3$ (1,3- 2,8; 37); PLAM/PL $0,8 \pm 0,1$ (0,5- 0,9; 37); PLAM/PLPM $4,3 \pm 2,6$ (1,1 – 13,4; 37); PWM/PWE $1,1 \pm 0,1$ (0,9 – 1,3; 37). Deuteromerito alargado, obpanduriformes con los margenes estrechos a linealmente elongado (Fig. 5 a, b, e y f). Medidas: DL $785,3 \pm 211,8$ (298 – 1161,4 ; 37); DWE $49,5 \pm 14,8$ (27,8 – 81,2; 37); DWM $54,6 \pm 14$ (31,1- 84,3; 37); DLAM $200,3 \pm 104,03$ (52,6 – 476,6 ; 37); DLPM $585,3 \pm 193,1$ (234,8- 1052,3; 37); DL/DWE $16,2 \pm 3,38$ (10,7- 22,8 ; 37); DL/DWM $14,5 \pm 2,4$ (9,6 – 19; 37); DLAM/DL $0,3 \pm 0,1$ (0,1- 0,6; 37); DLAM/DLPM $0,4 \pm 0,3$ (0,1-1,2; 37); DWM/DWE $1,1 \pm 0,09$ (1 – 1,4; 37); PTL $864,5 \pm 224,6$ (345,8 – 1273,8; 37). *Indices:* PTL/PL $10,9 \pm 1,98$ (6,9- 15,7; 37); DL/PL $9,9 \pm 1,98$ (5,9 – 14,7; 37); DWM/PWM $1,23 \pm 0,16$ (0,96 – 1,7; 37); PTL/DL $1,1 \pm 0,02$ (1,07 – 1,17; 37). Núcleo era de forma orbicular, con el eje vertical u horizontal levemente mayor y ubicado en la mitad del deuteromerito o levemente desplazado (Fig 5 a): NL $23,4 \pm 5,8$ (12,8-37,5; 37); NW $21,5 \pm 4,2$ (14,2 – 31; 37); NDS $411,8 \pm 187,8$ (92,8 – 859,8; 37); NL/NW $1,1 \pm 0,3$ (0,58 – 1,9; 37); NDS/NL $17,6 \pm 8,4$ (5,8- 52,4; 37); DL/NDS $2,2 \pm 0,96$ (1,3 – 5,5; 37).

- Satélite o segundo gamonte: el protomerito es dolioforme, y la membrana anterior del acetábulo extendida anteriormente en forma de copa (Figs. 5 cd y 6). Protomerito: PL $55,6 \pm 13$ (31,4 – 91; 37); AcW $28,8 \pm 6,2$ (16,5- 41,8; 37); AcD $7,2 \pm 1,9$ (4- 13,8; 37); PWE $39,3 \pm 9,4$ (21,4 - 64,4; 37); PWM $42,7 \pm 10,2$ (23,8-65,7; 37); PLAM $37,4 \pm 12,8$ (10,3 – 62,7; 37); PLPM $17,8 \pm 8,9$ (6,4 -53,1; 37); PDSW $39,9 \pm 8,9$ (22,2- 59,7 ; 37); AcW/AcD $4,2 \pm 1,02$ (2,3 – 6,8; 37); AcW/PWM $0,68 \pm 0,1$ (0,53- 0,9; 37); AcD/PL $0,13 \pm 0,03$ (0,09- 0,25; 37); PL/PWE $1,4 \pm 0,25$ (1-2;37); PL/PWM $1,3 \pm 0,2$ (0,9- 1,8; 37); PL/PDSW $1,4 \pm 0,3$ (0,8 – 2,2; 37); PLAM/PL $0,67 \pm 0,1$ (0,2-0,9; 37); PLAM/PLPM $2,6 \pm 1,4$ (0,25 -7; 37); PWM/PWE $1,09 \pm 0,07$ (1-1,3; 37). Deuteromerito: elongado; dolioforme, muy comprimido en el eje horizontal (Fig. 5 a, b, e y f) .DL $723,4 \pm 202,9$ (250,6 – 1085,6;37); DWE $48 \pm 12,9$ (22,5 - 76; 37); DWM

52,9 \pm 13,1 (27,4 – 83,9; 37); DLAM 181,9 \pm 82,9 (32,7-382,2; 37); DLPM 541,6 \pm 145,6 (217,9 – 840,7; 37); DL/DWE 16,1 \pm 5,6 (10,2 – 45,4; 37); DL/DWM 13,6 \pm 2,3 (9,1 – 20,2; 37); DLAM/DL 0,25 \pm 0,07 (0,13 – 0,4; 37); DLAM/DLPM 0,34 \pm 0,13 (0,15 – 0,7; 37); DWM/DWE 1,2 \pm 0,6 (0,9 – 4,5; 37); STL 779,03 \pm 212,7 (282 – 1166; 37); *Indices*: STL/PL 14,1 (8,9 – 19,5 \pm 2,8, 37) ; DL/PL 13,06 (7,98 – 18,5, \pm 2,8, 37); DWM/PWM 1,24 (1 – 1,5, \pm 0,1, 37); STL/DL 1,08 \pm 0,02 (1 – 1,13; 37). El núcleo orbicular, ubicado en la mitad del deuteromerito o levemente desplazado posteriormente (Fig. 5 a, b y f): NL 20,5 \pm 5,6 (12,3 – 34,5; 37); NW 21 \pm 3,1 (14,7 – 28,2; 37); NDS 345,5 \pm 147,8 (81,3 – 672,1; 37); NL/NW 1 \pm 0,25 (0,6 – 1,6; 37); NDS/NL 16,8 \pm 5,9 (5,3 – 34,9; 37); DL/NDS 2,3 \pm (1,4 – 3,4; 37).

Gametoquistes (Fig. 7 d) (n=30) de color blanco opaco, de forma orbicular. Longitud 324,6 \pm 39,8 (284,4 - 440,4), anchura 280,5 \pm 27 (216-336,5), GL / GW 1,2 \pm 0,1 (0,9 – 1,4). Los gametoquistes fueron recogido de las heces e incubados bajo condiciones de humedad y temperatura controlada, se produjo la extrusión, con liberación de ooquistes en cadenas dentro las 24-48 horas (Fig. 7 e, f).

Ooquistes (Fig. 7 f): de forma dolioformes, con espinas en los vértices. OL 7,4 \pm 0,7 (7-8,5; 30); OW 4,5 \pm 0,2 (4,3-4,6; 30); OL/OW=1,7 \pm 0,2 (1,5-1,9; 30).

Al existir doble infección no fue posible determinar a qué género correspondían los trofozoítos encontrados en el intestino medio de *B. dubia*; sin embargo, a continuación se detallan:

Trofozoítos:

- (1) Trofozoíto (Fig. 8 a, b): los trofozoítos jóvenes eran formas solitarias, extracelulares unidas al epitelio ventricular del hospedador. El epimerito o disco de fijación se desarrolla intracelularmente en una única célula epitelial del hospedador (Fig. 8 c, d). Epimerito simple amplio ovoide en los trofozoítos jóvenes solitarios, llegando a ser ovoide predominando el eje horizontal en los trofozoítos solitarios maduros. Protomerito, superficialmente ovoide en trofozoítos jóvenes solitarios, convirtiéndose ampliamente ovoide en trofozoítos solitarios maduros. Deuteromerito obdeltoide en trofozoítos solitarios juvenes,

llegando a ser en los trofozoítos maduros obdeltoides con los márgenes estrechos (Fig. 8 a, b). Núcleo Orbicular o circular con varios cariosomas.

- (2) Trofozoíto (Fig. 9): los trofozoítos jóvenes eran formas solitarias, extracelulares unidas al epitelio ventricular del hospedador. El epimerito con desarrollo intracelular en una única célula epitelial del hospedador (Fig. 8 c, d; 9 c). Epimerito muy elongado de linealmente ensiforme, a ser linealmente panduriforme en los trofozoítos maduros, con un engrosamiento en forma de anillo en la base del epimerito (Fig. 9 b, d). El Protomerito se observó ovoide en trofozoítos jóvenes llegando a ser piriforme comprimido verticalmente, hay una ligera constricción en el septo que une el protomerito con el deuteromerito en trofozoítos solitarios maduros. El deuteromerito es obovoide equilátero, convirtiéndose en obovoide con los márgenes estrechos en los trofozoítos solitario mayores (Fig. 9). Núcleo orbicular con 2 cariosomas grandes ubicados en el margen del núcleo.

-Resumen taxonómico de *Blabericola* sp. y *Protomagalhaensia* sp.

Hospedador: *Blaptica dubia* (Serville, 1839), Familia Blaberidae.

Localidad: ciudad de La Plata y Tandil, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Sitio de infección: los trofozoítos, gamontes libres y en sisigia fueron obtenidos a lo largo del intestino medio y ciegos gástricos. Los gametoquistes se obtuvieron del intestino grueso, el recto y las heces.

La prevalencia del parasitismo fue del 100% (N=50).

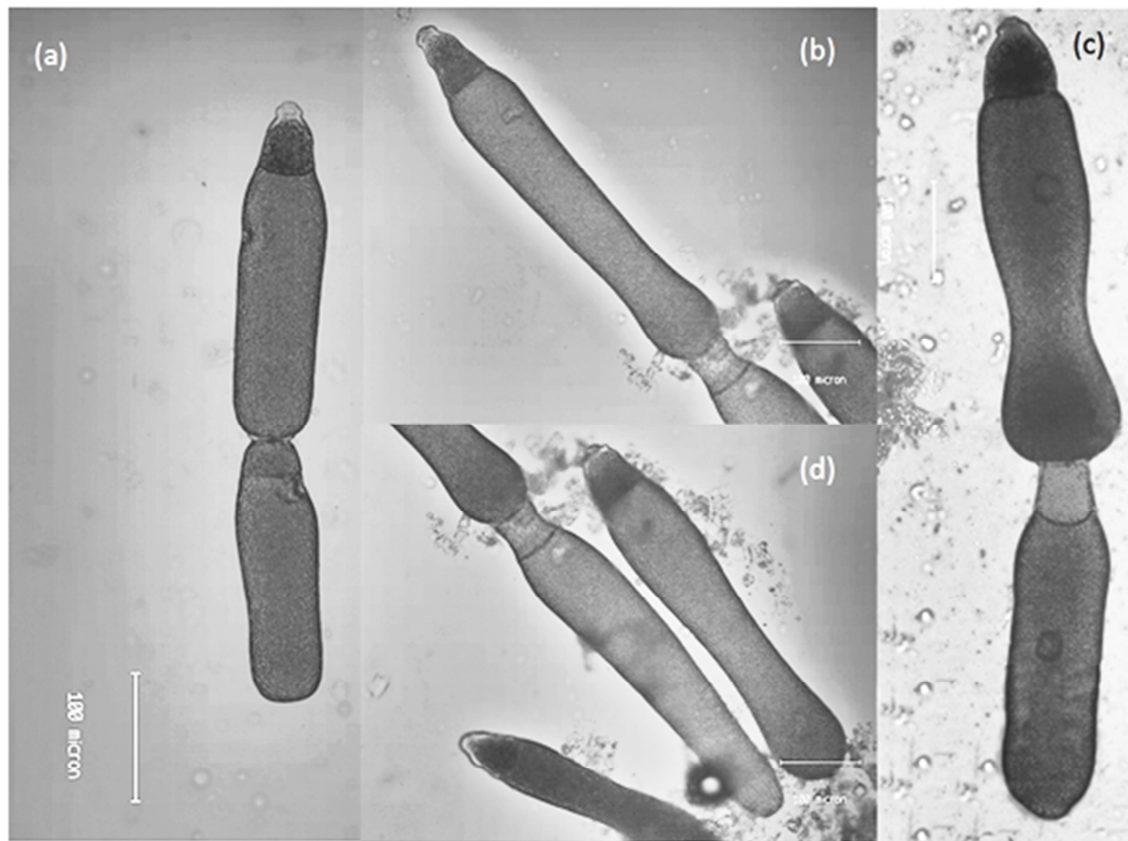


Figura 4. *Blabericola* sp. (a) gamontes en asociación caudofrontal; (b) primito o primer gamonte; (c) detalle de la ubicación de los núcleos en los gamoentes en asociación; (d) Detalle de la unión del primito con el satélite, y dos gamontes libres flanqueando al satélite.

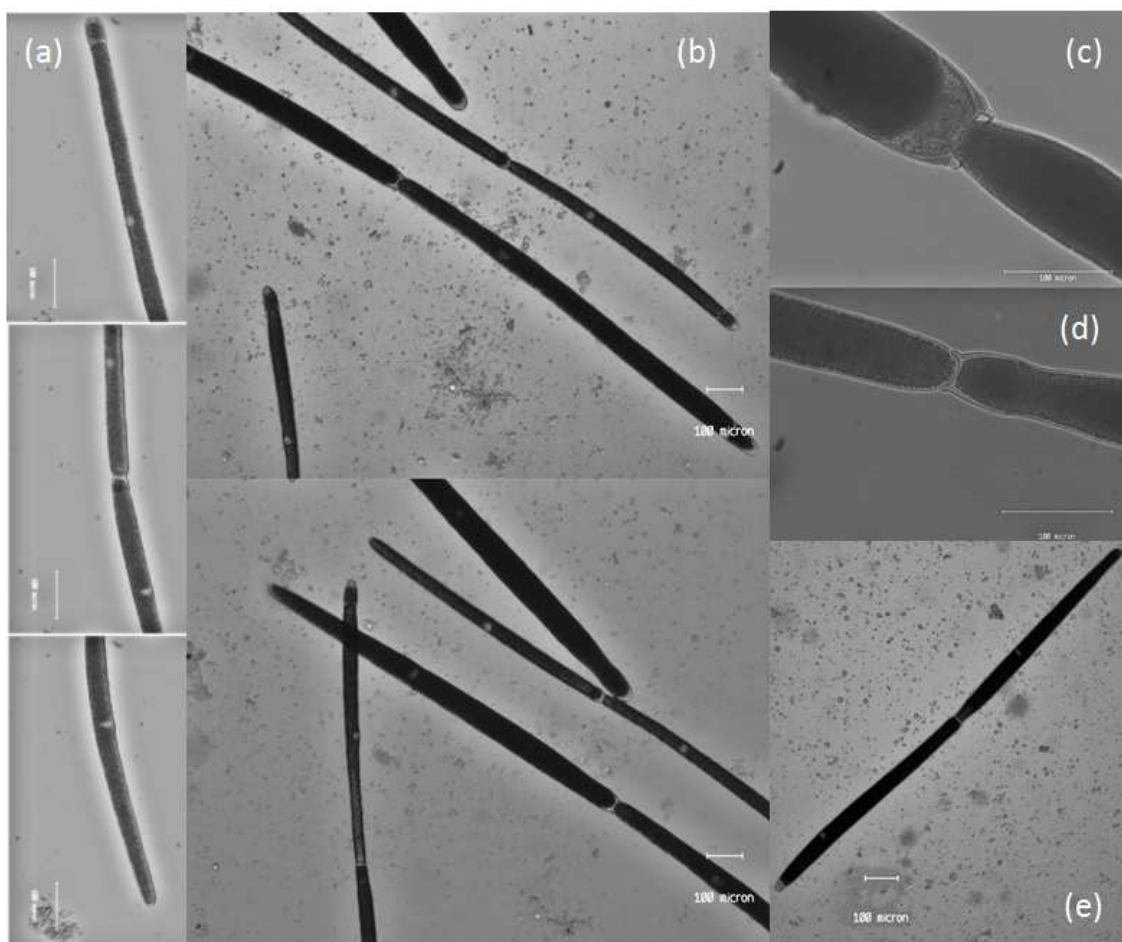


Figura 5. *Protomagalhaensia* sp. (a) gamontes en asociación caudofrontal; (b) variedad de tamaños observada en gamontes en asociación; (c) y (d) Detalle de la unión del primito con el satélite.

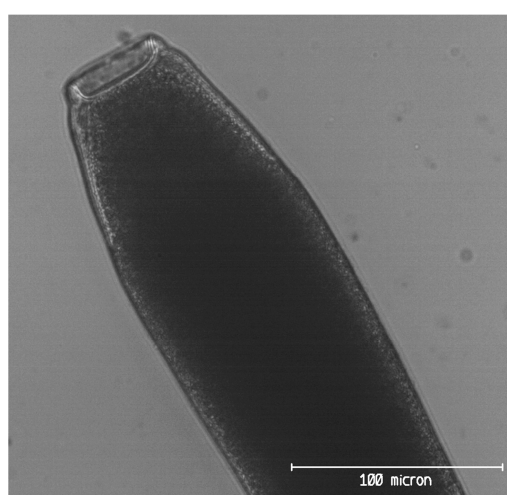


Figura 6. Detalle del protomerito del satélite de *Protomagalhaensia* sp., donde se observa la membrana anterior de acetábulo en forma de copa.

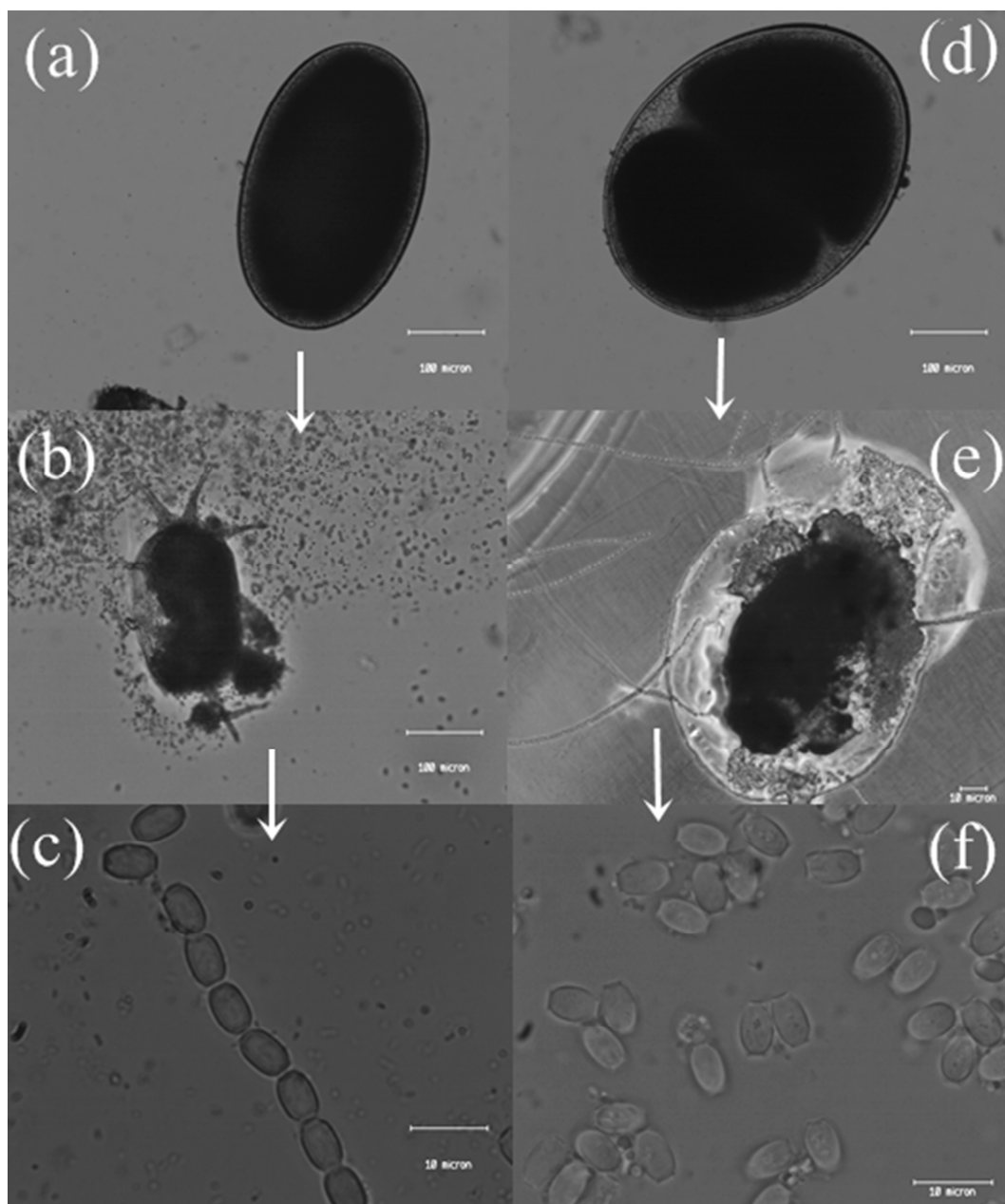


Figura 7. (a) gametoquistes de *Blabericola* sp., eliptoide; (b) extrusión a través de tubos; (c) con liberación de ooquistes de forma dolioformes. (d) gametoquiste de *Protomagalhaensia* sp. , orbicular; (e) extrusión simple; (f) con liberación de ooquistes de forma dolioformes.

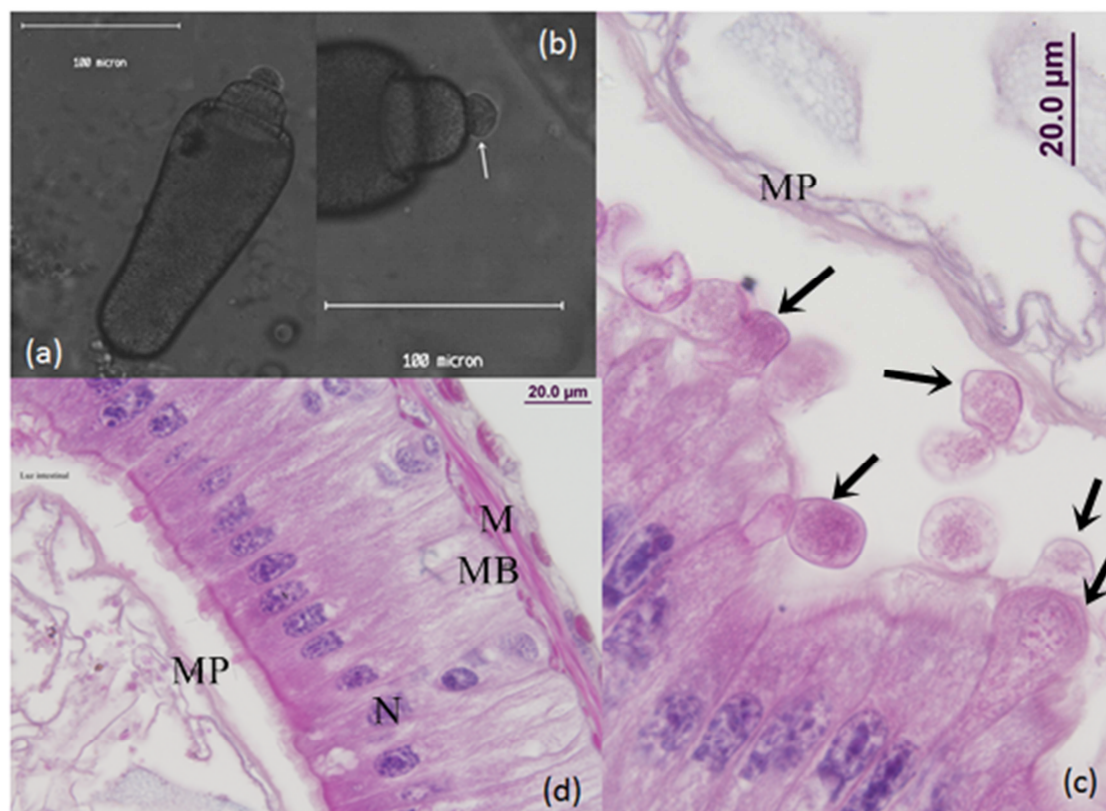


Figura 8. (a) y (b) trofozoíto, la flecha blanca marca el epimerito ovoide. (c) y (d) corte transversal del intestino medio de *Blaptica dubia* teñido con hematoxilina-eosina. (c) trofozoítos con el septo formado, unidos al intestino, marcados con flechas negras y algunos trofozoítos libres en la luz intestinal. (d) se ven tres trofozoítos en el inicio de la unión con las células intestinales, el septo aún no se formó, y se ven los bordes de las células en cepillo del intestino del hospedador. (MP) membrana peritrófica. (N) núcleo de la célula intestinal. (MB) membrana basal. (M) musculatura longitudinal interna y circular externa.

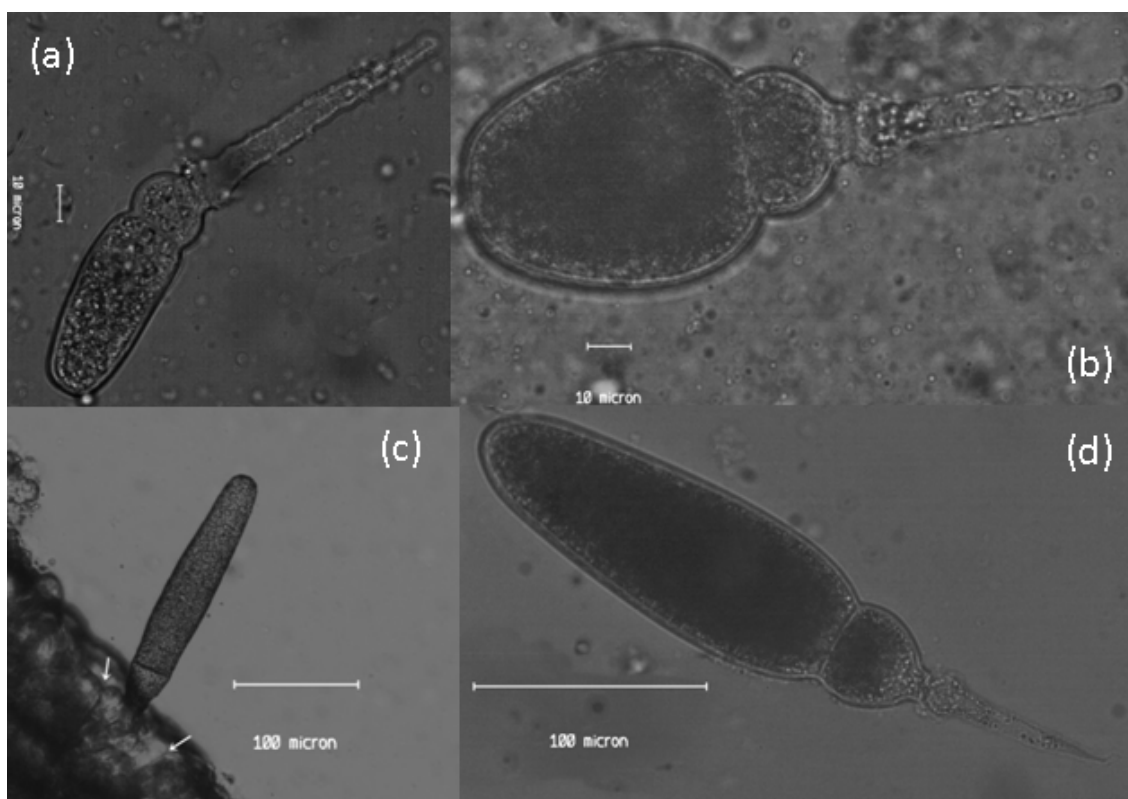


Figura 9. Trofozoítos. (a) y (b) trofozoítos jóvenes. (c) trofozoítos unidos a la célula intestinal, las flechas blancas marcan los límites de la célula. (d) trofozoíto maduro.

Familia Gregarinidae Labbé, 1899

Género Gregarina Dufour, 1828 (= Degiustia Levine, 1979 [in part]) (= Erhardovina Levine, 1985 [in part])

Asociación temprana; caudofrontal; epimerito cónico, en forma de botón, globular, o cilíndrico; ooquistes doliformes o en " forma de barril", navicular o esférico; gametoquistes dehiscentes en largas cadenas de varios esporoductos.

Gregarina sp.

Los Trofozoítos jóvenes observados presentaron un epimerito simétrico, simple e hialino, con forma cilíndrica, redondeado en el tercio anterior y con el extremo posterior truncado; unido por un tallo delgado al protomerito redondeado; seguido por un deutomerito más largo que ancho (Fig. 12 a). Fue difícil observar los trofozoítos con el epimerito ya que el septo del epimerito se rompe fácilmente, y es usual que permanezca dentro de la célula del hospedador.

Los gamontes libres tenían el protomerito y deutomerito ovoide (Fig.12 b). Los gamontes al formar asociaciones tempranas eran de forma y tamaño variable. En general en las asociaciones tempranas eran largos y delgados, romos en el extremo posterior, el protomerito del primito era cónico con la punta truncada, o con una papila. Se observó una ligera constricción en el tabique que une el protomerito y deutomerito. Deutomerito alargado elipsoidalmente, variando en anchura pero poco a lo largo de la longitud, y ampliamente redondeada en su extremo posterior. Excepto, el extremo unido al satélite que se encontraba levemente aplanado. El satélite tiene un amplio protomerito aplanado.

Gamontes en asociación: Las mediciones son tomadas de gamontes maduros en asociación. Son gamontes anisomórficos; con el epimerito ausente, reemplazado por una cicatriz superficial en el margen anterior del protomerito del primito, que se hace menos aparente en la madurez; con asociación precoz, en tándem, caudofrontal. Los gamontes en asociación presentaron un cuerpo robusto, levemente irregular en contorno (Fig. 11, 12c). El deutomerito de los gamontes en asociación era denso y finamente granular de color oscuro; el protomerito se observó ligeramente menos denso, de color canela

oscuro. El epicito o capa externa de citoplasma era gruesa, principalmente en el protomerito del primito (Fig. 12 c, d). Índices: PriTL / SatTL $0,91 \pm 0,05$ (0,83 a 0,96; 30); PriPL / SatPL $1,62 \pm 0,13$ (1,47 a 1,82; 30); PriDL / SatDL $0,8 \pm 0,05$ (0,75 a 0,9; 30); PriPWM / SatPWM $0,96 \pm 0,04$ (0,94 a 1,03; 30); PriDWM / SatDWM $1,09 \pm 0,04$ (1,05 a 1,15; 30).

- *Primito*: Longitud total (PrTL) $791,3 \pm 23,3$ (759,5– 821,8; 30). Epimerito ausente. El Protomerito era redondeado anteriormente, y cilíndrico en los dos tercios posteriores u ovoide. Un poco más ancho que largo (Fig. 12 c). Medidas: PL $130,8 \pm 12,1$ (110,1-139,6; 30); PWT $79,6 \pm 5,8$ (69,7 – 84,2; 30); PWE $197,6 \pm 4,6$ (191,7- 203,9; 30); PWM $204,2 \pm 3,3$ (200,8-208,6; 30); PLAM $75,3 \pm 6,1$ (68,2 – 81,6; 30); PLPM $55,5 \pm 8,9$ (40,5-62; 30); PDSW $173,9 \pm 6,5$ (163,4 – 179,7; 30); PL / PWT $1,6 \pm 0,04$ (1,6 a 1,7; 30); PL / PWE $0,7 \pm 0,06$ (0,6 - 0,7; 30); PL / PWM $0,6 \pm 0,06$ (0,5 - 0,7;30); PL / PDSW $0,8 \pm 0,08$ (0,6-0,9; 30); PLAM / PL $0,6 \pm 0,04$ (0,5 - 0,6; 30); PLAM / PLPM $1,4 \pm 0,2$ (1,1 - 1,7; 30); PWE / PWT $2,5 \pm 0,2$ (2,3 a 2,8; 30); PWM / PWT $2,6 \pm 0,2$ (2,4 – 2,9; 30); PWM / PWE $1 \pm 0,01$ (1 a 1,1; 30). Deuteromeritoera alargado elipsoidal, redondeado en su extremo posterior profundamente deltoides, y el septo que une el protomerito con el deuteromerito con una leve constricción o sin (Fig. 12c). Medidas: DL $660,5 \pm 25,1$ (620,6 - 686,7; 30), DWE $418,6 \pm 20,4$ (383,1 – 432,5; 30); DWM $427,7 \pm 21,5$ (392- 447,1; 30), DLAM $221,7 \pm 19,2$ (199,7- 246,7; 30), DLPM $438,5 \pm 23,1$ (401,5- 464,7; 30), DL / DWE $1,6 \pm 0,1$ (1,44 - 1,71; 30); DL / DWM $1,55 \pm 0,1$ (1,41-1,67 ;30), DLAM / DL $0,3 \pm 0,03$ (0,3-0,36; 30), DLAM / DLPM $0,51 \pm 0,01$ (1,01- 1,03; 30), DWM / DWE $1,02 \pm 0,01$ (1,01 a 1,03; 30). El núcleo era pequeño, esférico y apenas visibles, aproximadamente orbiculares a ampliamente elipsoide. Índices: TL / PL $6,1 \pm 0,6$ (5,5 - 7,1; 30), DL / PL $5,1 \pm 0,63$ (4,5 - 6,1; 30), TL / DL $1,2 \pm 0,02$ (1,16-1,22; 30), DWM / PWM $2,1 \pm 0,1$ (1,9 – 2,2; 30).

-*Satélite*: Longitud total (SatTL) $873,9 \pm 34,8$ (819,3-911,5; 30). El protomerito se observó ligeramente aplanado en la región anterior, y con poca o ninguna constricción en el tabique, era más ancho que el protomerito del primito, el doble de ancho que de alto (Fig 12 d). Medidas: AscSW $142,1 \pm 7,9$ (132,03-148; 30); PL $80,9 \pm 9,4$ (67,6-88,7;30); PWE $194,4 \pm 6,7$ (183,3- 205,5; 30); PWM $211,9 \pm 9,6$ (195,6-220,4; 30); PLAM $50,7 \pm 6,4$ (40,1-57,2; 30); PLPM $30,2 \pm 7,7$ (17,3-35,5; 30); PDSW $212,6 \pm 13,5$ (191,9-225,3;30); PL / AscSW $0,57 \pm 0,09$ (0,46-0,67; 30); PL / PWE $0,4 \pm 0,06$ (0,34-0,48; 30); PL / PWM $0,38 \pm 0,06$ (0,32-0,45; 30); PL / PDSW $0,38 \pm 0,06$ (0,31 -

0,46; 30); PLAM / PL $0,63 \pm 0,08$ (0,54-0,74; 30); PLAM / PLPM $1,8 \pm 0,68$ (1,17-2,9;30); PWE / AscSW $1,37 \pm 0,05$ (1,31-1,45; 30); PWM / AscSW $1,49 \pm 0,05$ (1,44 – 1,58 ;30); PWM / PWE $1,09 \pm 0,03$ (1,07 - 1,14 ; 30). El deuteromerito era irregularmente cilíndrico terminando en una punta roma, con una constricción poco profunda en el septo que une el protomerito- deuteromerito (Fig. 12 c). Medidas: DL $793,1 \pm 30,2$ (751,7 - 825,6; 30); DWE $373,1 \pm 35,6$ (311,5-400,6; 30), DWM $394,9 \pm 31,1$ (342,2-423,5; 30), DLAM $178,2 \pm 45$ (121,1-237,9; 30), DLPM $614,8 \pm 62,7$ (513,8-675,6; 30), DL / DWE $2,14 \pm 0,23$ (1,92-2,5;30), DL / DWM $2,02 \pm 0,17$ (1,85-2,27; 30), DLAM / DL $0,23 \pm 0,06$ (0,16- 0,32; 30), DLAM / DLPM $0,3 \pm 0,11$ (0,18 – 0,46; 30), DWM / DWE $1,06 \pm 0,02$ (1,04 – 1,1; 30). Núcleo orbicular con un número variable de cariosomas, excéntricamente colocado y apenas visible. Índices: TL / PL $10,9 \pm 1,1$ (9,77 – 12,12; 30), DL / PL $9,91 \pm 1,11$ (8,77 – 11,12; 30), DWM / PWM $1,68 \pm 0,09$ (1,75 – 1,98; 30), TL / DL $1,10 \pm 0,01$ (1,09 -1,11; 30).

Gametoquistes (n= 48) eran de color blanco opaco de forma esféricos u ovoides (orbiculares); con una capa hialina envolvente. De tamaño variable, el largo $274,06 \pm 84,9$ (197,4 - 629,7); el ancho $251,8 \pm 57,7$ (184,2 - 447,1) GL/GW $1,1 \pm 0,09$ (0,99 - 1,4). Los conductos de esporas son largos y llegan al exterior de la cubierta transparente del quiste, el número de esporoductos fue de 8 a 10. Los gametoquistes fueron recogido de las heces e incubados bajo condiciones de humedad y temperatura controlada, se produjo la extrusión, con liberación de ooquistes en cadenas dentro las 24 a 48 horas (Fig. 13 a, d). En la Figura 10, se ve que existe una correlación lineal entre el largo y ancho de los gametoquistes.

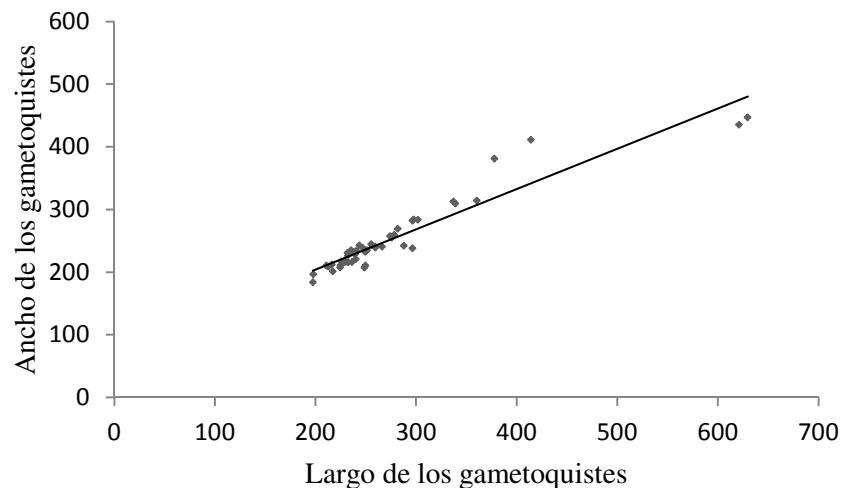


Figura 10. El gráfico muestra la correlación lineal positiva entre el largo y el ancho de los gametoquistes.

Los ooquistes (Fig. 13 e, f): eran dolioformes, es decir, en forma de barril a cilíndricos alargados, con los extremos truncados, miden ($n=30$) $8,7 \pm 0,4$ por $4,2 \pm 0,4$ μ . Lanzados en cadenas a través de tubos de esporas. Medidas OLM $17,4 \pm 0,29$ (17-18;30), OLI $16 \pm 0,28$ (15,5 - 16,5; 30), OWM $8,6 \pm 0,51$ (7,5 - 9,9; 30), TWE $4,5 \pm 0,35$ (3,8 - 5,1; 30), TWI $3 \pm 0,24$ (2,05 - 3,05; 30), OLM / OLI $1,1 \pm 0,02$ (1-1,1; 30), OLM / OWM $2 \pm 0,12$ (1,7 - 2,3; 30), OLI / OWM $1,9 \pm 0,11$ (1,6 - 2,2; 30), OLM / TWE $3,9 \pm 0,33$ (3,4 - 4,6; 30), OLI / TWI $5,4 \pm 0,46$ (4,6- 6,4; 30), OWM / TWE $1,9 \pm 0,17$ (1,06 - 2,03; 30) , TWE / TWI $1,5 \pm 0,12$ (1,2 - 1,7; 30).

-Resumen taxonómico de *Gregarina sp.*

Hospedador: *P. fuliginosa*, ninfas y adultos.

Localidad: La Plata, provincia de Buenos Aires.

Sitio de infección: los trofozoítos, gamontes libres y en sisigia fueron obtenidos a lo largo del intestino medio y ciegos gástricos. Los gametoquistes se obtuvieron del intestino grueso, el recto y las heces.

La Prevalencia en el intestino de ninfas y adultos de *P. fuliginosa* (N=100) fue del 30%. El nivel de infección en cada cucaracha fue bajo.

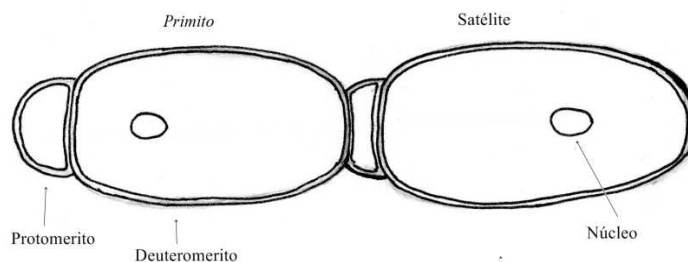


Figura 11. Esquema de los gamontes en asociación de *Gregarina* sp.

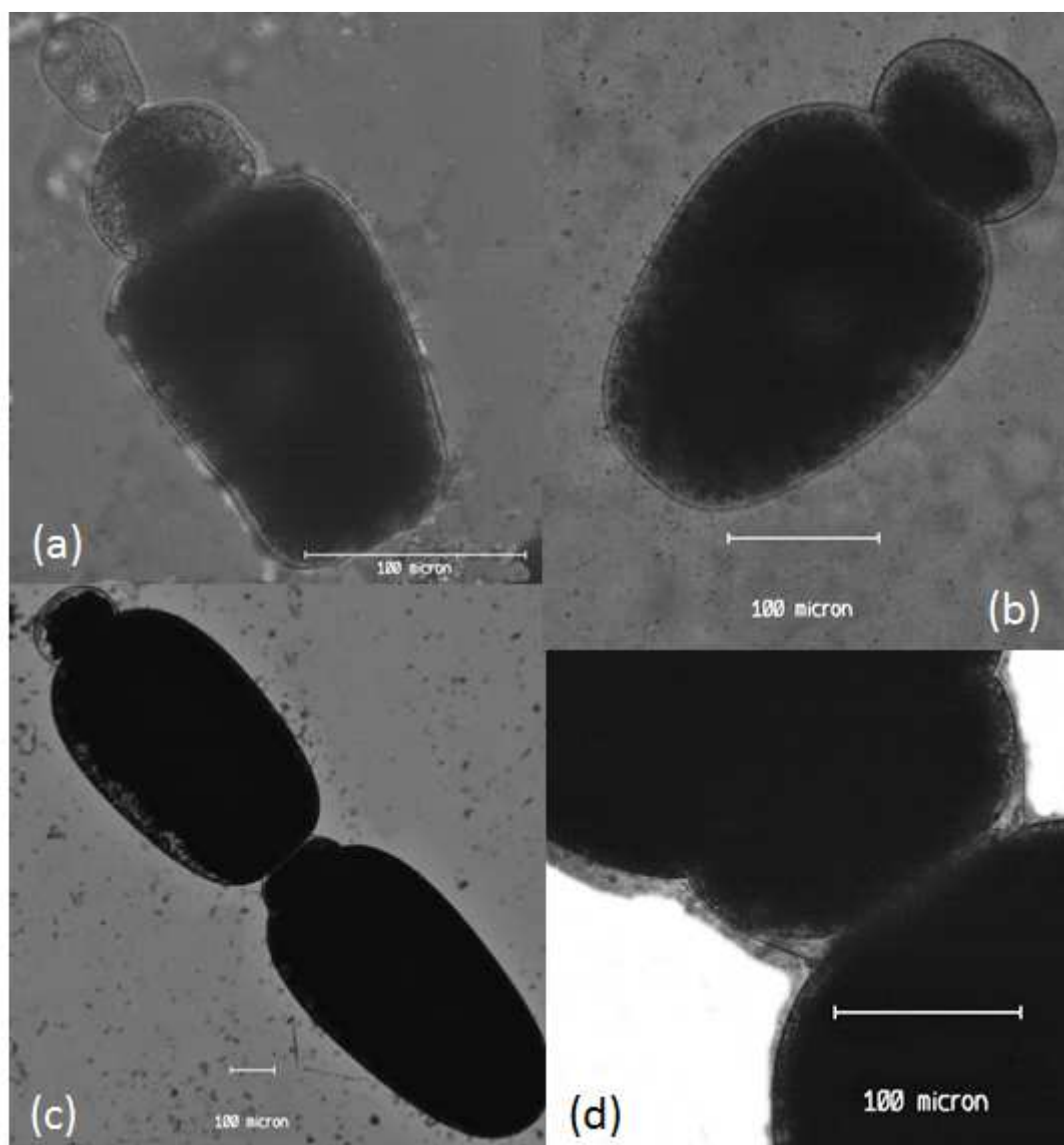


Figura 12. Trofozoítos y gamontes de *Gregarina* sp. (a) trofozoíto con el epimerito, protomerito y deuteromerito; (b) gamonte libre (c) gamontes en asociación; (d) detalle de la unión de los gamontes en asociación.

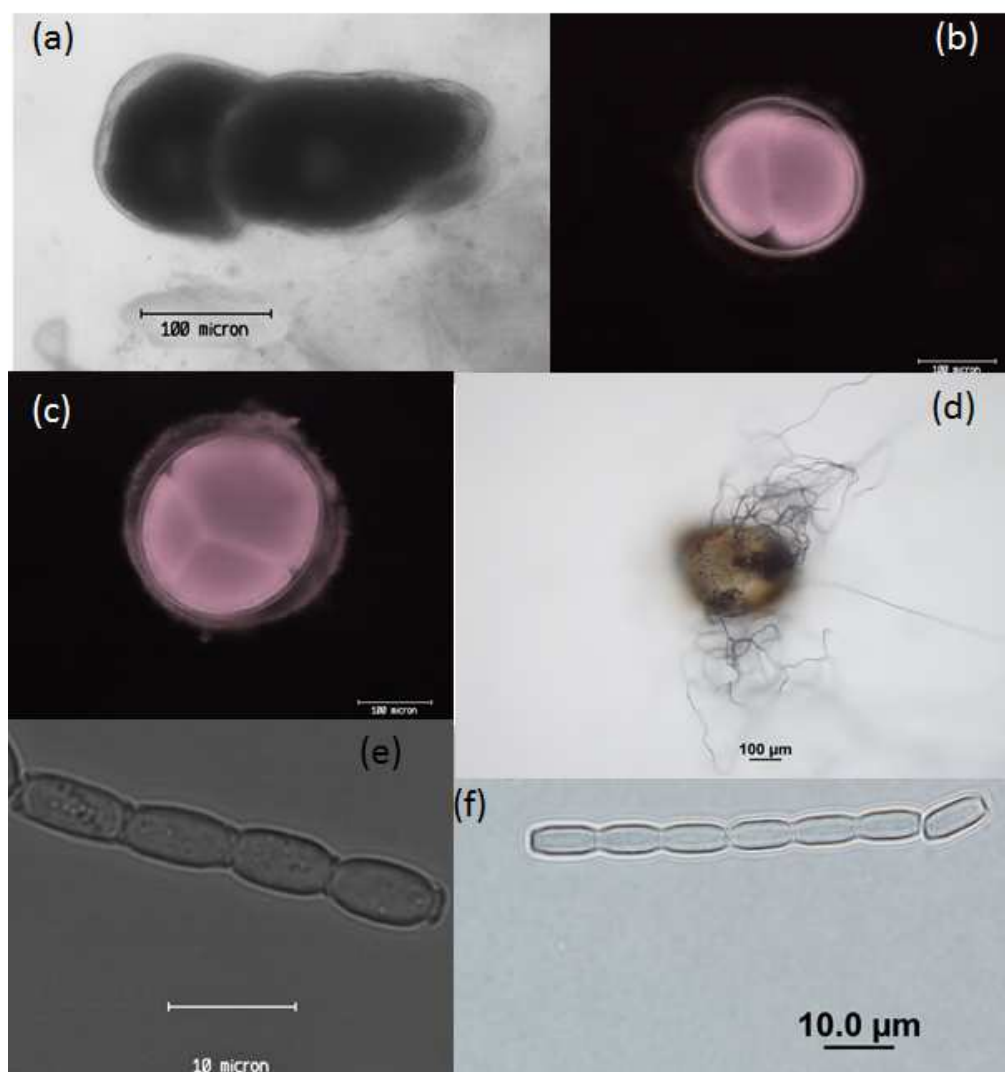


Figura 13. Formación y extrusión de gametoquistes de *Gregarina* sp. (a) gamontes en asociación iniciando la formación del gametoquiste. (b) gametoquiste fotografiado con DIC con los gamontes en conjugación; (c) gametoquiste en división, fotografiado con DIC; (d) gametoquiste con las cadenas de ooquistes; (e) ooquistes dolioformes o cilíndricos alargados; (f) cadenas de ooquistes.

DISCUSIÓN

Fue posible identificar a nivel de género a las gregarinas presentes en la cucaracha argentina, *B. dubia*. La morfología general de los gamontes en asociación permite diferenciar a ambos géneros. En el género *Protomagalhaensia*, los gamonte en sisigia son alargados y de forma serpentiforme, y el punto de contacto de la asociación es superficialmente semiobpanduriforme en donde el extremo posterior del deuteromerito del primito esta comprimido y sujeto por un acetábulo formado a partir de las membranas anteriores de protomerito del satélite, dichas membranas toman la forma de una copa (Clopton 2010, 2011; Clopton & Hays, 2006). Sus epimeritos son gladiados a deltoides, el discos adhesivos carece de un diamerito, estos caracteres unen al género pero con poco valor taxonómico en la diferenciación de especies (Clopton, 2012b). Por lo mencionado en el párrafo anterior consideramos que es posible que el trofozoíto que nombramos N° 2 puede corresponder al género *Protomagalhaensia*. En *Blabericola* el punto de contacto de la asociación es una unión superficial, donde el extremo posterior del deuteromerito del primito esta incrustado de manera poco profunda a las membranas anteriores de protomerito del satélite, los gamontes implicados en la sisigia son de menor tamaño y de forma diferente, más anchos que los descriptos para *Protomagalhaensia* (Clopton 2012a).

En la actualidad hay 6 especies pertenecientes al género *Protomagalhaensia* descriptas todas en cucarachas y son *P. wolffi* Geus, 1969 encontrada en *Nauphoeta cinerea* (Oliver, 1789) (Blattodea: Blaberidae); *P. serpentula* (es la especie tipo del género) (de Magalhaes 1900) Pinto 1918 (= *Gregarina serpentula* de Magalhaes 1900) se encontró parasitando a *P. americana*; *P. blaberae* Peregrine, 1970, en *Blaberus boliviensis* Princis, 1946 (Blattodea: Blaberidae); *P. granulosa* Peregrine, 1970, en *Blaberus discoidalis* (Blattodea: Blaberidae) Serville, 1839; *P. cerastes* Clopton, 2010 en *Phoetalia pallida* (Blattodea: Blaberidae) y *P. vipera* Clopton, 2014 en *Eublaberus posticus* (Blattodea: Blaberidae). Las 6 especies se distinguen por las características y proporciones longitud / anchura del ooquiste. Las características morfológicas de los gamontes en asociación permite la distinción entre las especies de *Protomagalhaensia*. En particular, la longitud total del satélite y la longitud del deuteromerito del satélite que son únicos y significativamente diferente entre las especies de *Protomagalhaensia* según Clopton (2014a).

Clopton (2009) erigió el género *Blabericola* para unir las 4 especies de gregarinas conocidas hasta ese momento basado en caracteres morfológicos, moleculares y el ciclo de vida. En la actualidad son 5, y estas especies son: *B. migrator* (Clopton, 1995), descrita en *Gromphadorhina portentosa* Brunner von Wattenwyl, 1865 (Blattodea: Blaberidae: Oxyhaloinae: Gromphadorhini), se colocó originalmente dentro de *Leidyana* Watson, 1915. *B. haasi* (Geus, 1969), descrita en *Nauphoeta cinerea* (Olivier, 1789) (Blattodea: Blaberidae: Oxyhalinae: Nauphoetini), se colocó originalmente dentro de *Gregarina* Dufour, 1828 y fue luego cambiada a *Leidyana* por Clopton y Hays (2006). *B. cubensis* (Peregrine, 1970), descrita en *Blaberus discoidalis* Serville, 1839 (Blattodea: Blaberidae: Blaberinae), y *B. princisi* (Peregrine, 1970), descrita en *Blaberus boliviensis* Princis, 1946 (Blattodea: Blaberidae: Blaberinae), se colocó originalmente dentro de *Gregarina*. Por último Clopton (2014b) redescubre a la gregarina presente en *Rhyparobia maderae* (Blattodea: Oxyhaloinae: Nauphoetini) y hace una nueva combinación *B. rhyparobiae* (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae) Clopton (2012a). Las 5 especies se distinguen por diferencias significativas en el tamaño general y la forma de los gamontes en asociación, pero las diferencias se ven más claramente en el tamaño y la forma de los gametoquistes y ooquistes.

Clopton y Hays (2006) describen los ooquistes de *P. wolffi* y *B. haasi*, que se encuentran parasitando en el mismo momento el intestino de *N. cinerea*. Diferencian a ambos géneros por las características morfométricas de los gamontes en asociación; la forma del gametoquiste y la forma de los ooquistes. Clopton (2011), redescubre las características de ambas especies y plantea un estudio más amplio de los gametoquistes, revelando que mientras que el tamaño de los gametoquistes difieren entre *P. wolffi* y *B. haasi*, la forma del gametoquiste no es diagnóstico del género. Clopton (2011), realizó nuevas infecciones utilizando ooquistes confirmados de gametoquistes aislados y aclara que los datos de ooquistes de Clopton y Hays (2006) para *P. wolffi* son en realidad los datos de ooquistes para *B. haasi* y viceversa. En nuestro estudio hay que tener en cuenta que la extrusión de los ooquistes es diferente en ambos géneros, *Protomagalhaensia* libera los ooquistes por extrusión simple y *Blabericola* por extrusión a través de tubos, es decir, por el tipo de extrusión definimos a que género correspondió cada gametoquiste. En conclusión, las características morfométricas de los gamontes en asociación, presentadas en esta tesis, que corresponden a *Protomagalhaensia* sp. y *Blabericola* sp. nos sugieren que podrían tratarse de dos especies nuevas de gregarinas.

Para trabajos futuros se deben realizar infecciones experimentales con los ooquistes que emergen de los dos tipos de gametoquistes (según el tipo de extrusión), en cucarachas libres de gregarinas, para determinar el ciclo completo y definir las características de cada género para determinar de manera fehaciente si estamos frente a dos nuevas especies. Y si es posible complementar con estudios moleculares, basados en los trabajos de Leander *et al.* (2003) y Clopton (2009).

Las gregarinas presentes en *P. fuliginosa*, al tener un trofozoíto con un epimerito simple, globular o cilíndrico, con gamontes en asociación caudofrontal precoz, gametoquistes con dehiscencia por esporoductos y ooquistes dolioformes, se pueden asignar al género *Gregarina* que fue establecido originalmente por Dufour (1828). Si bien este género es muy similar en varios aspectos al género *Leidyana* Watson (1915), que pertenece a la familia Leidyaniidae (Clopton, 2002). En *Leidyana* la asociación de gamontes se retrasa hasta el inicio de la sisigia mientras que en *Gregarina*, como ya se mencionó, la asociación de los gamontes es precoz. La descripción de *Gregarina* sp. comparte algunos caracteres con la observada para *G. blattarum*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existe una diferencia en varios autores al describir el protomerito del primito de los gamontes en sisigia de *G. blattarum*, difieren en la presencia o ausencia de una papila en el vértice del protomerito, por ejemplo Watson (1916b), y Schneider (1875) describen el protomerito del primito como redondeado anteriormente, y la misma autora en 1916a, describe el protomerito del primito como cónico, o con una papila en extremo anterior, hay que considerar que Watson solo pudo medir 4 gamontes en sisigia de un solo hospedador esto puede generar variaciones al comparar los gamontes en asociación, además esta especie tiende a unirse en sisigia precozmente, lo que genera gamontes en sisigia de tamaños muy diferentes, situación observada por Sprague en 1941. En las formas observadas en nuestro trabajo se ve que en las sisigias tempranas el protomerito del primito tiene una forma cónica con una papila protuberante en el extremo y en los gamontes en sisigia maduros, el protomerito del primito es redondeado anteriormente y la papila está reducida o ausente. Al observar un gran número de gametoquistes la forma varió desde ovoides a perfectamente esféricos, y otros entre estos dos extremos. Sprague 1941, analiza los gametoquistes de *G. blattarum* en *B. orientalis*, y describe que las diferencias en la forma se deben al espacio disponible en el momento de la formación del gametoquiste de gamontes maduros. Sprague mide 259 gametoquistes y demostró la existencia de una relación lineal positiva entre los dos ejes de los quistes, independientemente del tamaño del

gametoquiste, los rangos de variación que Sprague midió en el eje mayor fueron desde 250 a 800 μ y en el eje menor desde 150 a 650 μ , con una relación media entre el eje mayor y menor de 1,22; con un rango entre 1,1 a 1,4. Las medidas que nosotros tomamos a los gametoquistes reflejan una relación lineal positiva entre el largo y el ancho coincidiendo con las observadas por Sprague. Sin embargo, el rango de las medidas de nuestros gametoquistes es más estrecho que las medidas de Sprague 1941, estas diferencias pueden deberse al número de gametoquistes medidos. Las medidas de los gametoquistes coinciden con los rangos medidos por Watson 1916 para *G. blattarum*.

La forma de los ooquistes observadas en nuestro trabajo coinciden con las de Watson, 1916a y b, Sprague 1941 y Schneider (1875), hay que tener en cuenta que la mayoría de los autores describen la forma sin dar medidas, y las medidas de los ooquistes coinciden con Watson, 1916a y Sprague 1941. *Gregarina blattarum* fue descrita originalmente parasitando el intestino de la cucaracha *B. orientalis* en Alemania (von Siebold, 1839), desde ese momento ha sido citado en otras cucarachas como *P. americana*, *P. discoidalis*, *B. germanica*, *Parcoblatta pennsylvanica* y *B. craniifer*. Ha sido reportada en Reino Unido, Francia, Brasil, Polonia y Japón. Sin embargo Clopton & Gold (1996) sugieren que *G. blattarum* puede llegar a comprender un complejo de especies crípticas en lugar de una sola especie que parasitan una amplia gama de taxones de cucarachas. Sprague en 1941 sugiere que las variaciones en el tamaño de los quistes y discrepancias en los fenómenos nucleares sugieren que estamos ante dos o más variedades de *G. blattarum*. Eso también podría explicar las diferencias entre las medidas y formas encontradas en los diferentes autores. Por lo explicado anteriormente, esta sería la primer cita de una infección natural de *Gregarina* sp. en *P. fuliginosa*, para Argentina.

BIBLIOGRAFIA

- Branco J.A.C. (1998). Protozoários entomopatogênicos. P. 571-603. En: Controle Microbiano de insetos. Alves, S.B. (Edit.) 2da edición. 1163 p.
- Brooks W.M. (1988). Entomogenous Protozoa. In Ignoffo, C. M. ed. CRC Handbook of Natural pesticides.Vol. V. Microbial insecticides.Entomogenous protozoa and fungi.Florida, CRC Press pp. 1-149.

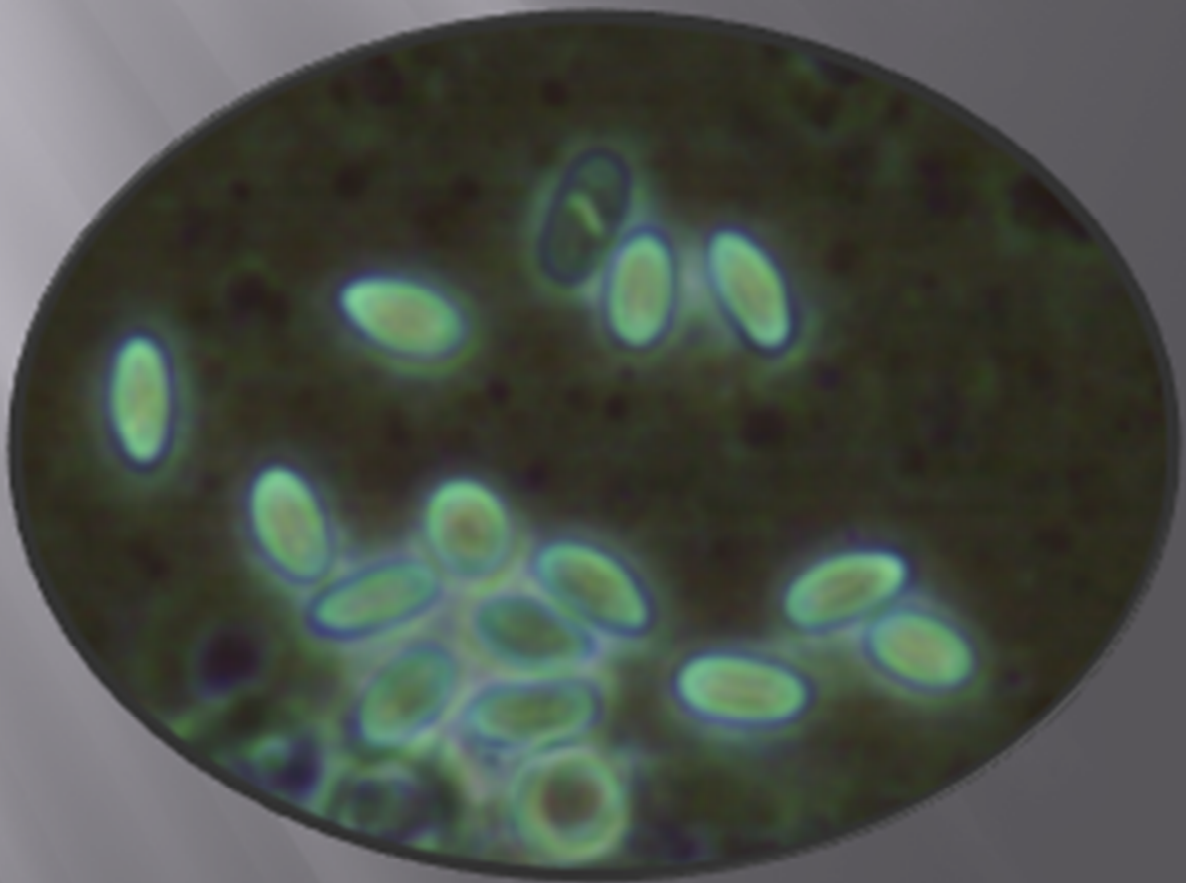
- Brooks W.M. & Jackson J. (1990). Eugregarines: current status as pathogens, illustrated in corn rootworms. In: Pinnock, D.E. (Ed.), 5th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaide, Australia, pp. 512–515.
- Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M. & Shostak A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own term: Magolis *et al.* Revisited. J. Parasitol. 83:575-583.
- Clopton R.E. (1995). *Leidyana migrator* n. sp. (Apicomplexa: Eugregarinida: Leidyaniidae) from the Madagascar hissing cockroach, *Gramphadorhina portentosa* (Insecta: Blattodea). Invertebr. Biol. 114 (4), 271–278.
- Clopton R.E. (1999). Revision of the genus *Xiphocephalus* and description of *Xiphocephalus ellisi* n. sp. (Apicomplexa: Eugregarinida: Stylocephalidae) from *Eleodes opacus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in the western Nebraska Sandhills. J. Parasitol. 85:84–89.
- Clopton R.E. (2002). Phylum Apicomplexa Levine, 1970: Order Eugregarinorida Léger, 1900. In: Illustrated Guide to the Protozoa, 2nd edition, J. J. Lee, G. Leedale, D. Patterson, and P. C. Bradbury, eds. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas. Pp. 205-288.
- Clopton R.E. (2004). Standard nomenclature and metrics of plane shapes for use in gregarine taxonomy. Comp. Parasitol. 71:130–140.
- Clopton R.E. (2009). Phylogenetic relationships, evolution, and systematic revision of the septate gregarines (Apicomplexa: Eugregarinorida: Septatorina). Comp. Parasitol. 76:167–190.
- Clopton R.E. (2010). *Protomagalhaensia cerastes* n. sp. (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae) parasitizing the pallid cockroach, *Phoetalia pallida* (Dictyoptera: Blaberidae). Comp. Parasitol. 77: 117–124.
- Clopton R.E. (2011). Redescription of *Protomagalhaensia granulosa* Peregrine, 1970 (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae) parasitizing the Discoid Cockroach, *Blaberus discoidalis* (Dictyoptera: Blaberidae). Comp. Parasitol. 78:63-72.

- Clopton R.E. (2012a). Synoptic revision of *Blabericola* (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae) parasitizing blaberid cockroaches (Dictyoptera: Blaberidae) with comments on recognizing and delineating gregarine species boundaries. J. Parasitol. 98:572–583.
- Clopton R.E. (2012b). Redescription of *Protomagalhaensia blaberae* Peregrine, 1970 (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae) parasitizing the Bolivian cockroach, *Blaberus boliviensis* (Dictyoptera: Blaberidae). Comp. Parasitol.
- Clopton R.E. (2014a). *Protomagalhaensia vipera* n. sp. (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae), a new Gregarine Parasitizing the Orange Headed Cockroach, *Eublaberus posticus* (Dictyoptera: Blaberidae). Comparative Parasitology 81(2):248256.
- Clopton R.E. (2014b). *Blabericola rhyparobiae* n. comb. (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae), Parasitizing the Madeira Cockroach, *Rhyparobia maderae* (Dictyoptera: Blaberidae). Journal of Parasitology 100(1):9398.
- Clopton R.E. & Gold R.E. (1996). Host Specificity of Gregarina blattarum von Siebold, 1839 (Apicomplexa: Eugregarinida) among Five Species of Domiciliary Cockroaches. J. Invertebr. Pathol. 67(3):219-23.
- Clopton R.E. & Hays J.J. (2006). Revision of the genus *Protomagalhaensia* and description of *Protomagalhaensia wolffi* n. comb. (Apicomplexa: Eugregarinida: Hirmocystidae) and *Leidyana haasi* n. comb. (Apicomplexa: Eugregarinida: Leidymanidae) parasitizing the lobster cockroach, *Nauphoeta cinerea* (Dictyoptera: Blaberidae). Comp. Parasitol. 73:137–156.
- Dellapé M.E., Marti G.A. Tranchida M.C., García J.J. (2005). First record of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) infected by the parasite *Ascogregarina culicis* (Ross) (Apicomplexa: Lecudinidae) in Argentina. Entomol. Vect. 12 (1): 111-115.
- Filipponi A. (1951). Su una gregarina (*Gregarina larvarum* n. sp.) rinvenuta in larve di *Blaps gibba* ottenute da allevamento. Rivista di Parassitologia 12:85–111.

- Filipponi A. (1955). Dimorfismo sessuale nei trofozoidi del genere *Gigaductus* (Sporozoa, Gregarinida, Gigaductidae). Rendiconti dell' Instituto Superiore di Sanità 18:97–114.
- Lange C.E. (1996). Protistas patógenos de insectos terrestres. En Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Edit. Lecuona R.E. Buenos Aires, Argentina. Pp 338.
- Lange C.E. & Cigliano M.M. (2004). The life cycle of *Leidyana ampulla* sp. n. (Apicomplexa: Eugregarinorida: Leidyaniidae) in the grasshopper *Ronderosia bergi* (Stål) (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae). Acta Protozool. 43:81–87.
- Leander B.S., Clopton R.E. and Keeling P.J. (2003). Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin. Int. J. Syst. Evol. Micr. 53:345–354.
- Levine N.D. (1971). Uniform terminology for the protozoan subphylum Apicomplexa. J. Protozool. 18: 352–355.
- Levine N.D. (1988). The protozoan phylum Apicomplexa. Vol I. Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, Florida. 203 pp.
- Lopes R.B., Alves S.B. (2005). Effect of *Gregarina* sp. parasitism on the susceptibility of *Blattella germanica* to some control agents. J. Invertebr. Pathol. 88 :261–264
- Luna G.C., Henry J.E., Ronderos R.A. (1981). Infecciones experimentales y naturales en Acridios de la República Argentina (Insecto: Orthoptera). Rev. Soc. Entomol. Argen. 40: 243-247.
- Maddox J.V. (1987). Protozoan diseases, p. 417-452. In Fuxa J.R. & Tanada Y. (eds.), Epizootiology of Insect Diseases. New York, John Wiley & Sons, 555p.
- Olsen O. W. (1986). Animal parasites: their life cycles and ecology. 3th edition. New York: Dover, 562 pp.
- Randall J, Cable J, Guschina IA, Harwood JL, Lello J (2013) Endemic infection reduces transmission potential of an epidemic parasite during co-infection. Proc. R. Soc. B. 280: 20131500.

- Schneider A. (1875). Contributions à l'histoire des Grégarines des Invertébrés de Paris et de Roscoff. Arch. Zool. expér., 4, pp. 493-604, 7 Pl.
- Sprague V. (1941). Studies on *Gregarina blattarum* with particular reference to the chromosome cycle.III. Biol. Monogr. 18: 5-57.
- Villanueva F.R. (2004). Generalidades y potencialidad en biocontrol de las gregarinas entomoparásitas. Ciencia UANL vol. VII, N° 3: 355-360.
- Watson M.E. (1915). Some New Gregarine Parasites from Arthropoda. Jour. Parasit., 2: 27-36; 2 pl.
- Watson M.E. (1916a). Observations on Polycystid Gregarines from Arthropoda. J. Parasitol. Vol. 3, No. 2: 65-75.
- Watson M.E. (1916b). Studies on Gregarines. III. Biol. Monogr. 2: 1-250
- Watwood S., Janovy Jr., Peterson E. and Addison M.A. (1997). *Gregarina triboliorum* (Eugregarinida: Gregarinidae) n. sp. from *Tribolium confusum* and resolution of the confused taxonomic history of *Gregarina minuta* Ishii, 1914. J. Parasitol. 83:502–507.
- Zuk M. (1987). The effects of gregarine parasites on longevity, weight loss, fecundity and developmental time in the field crickets, *Gryllus veletis* and *G. pennsylvanicus*.Ecol. Entomol. 12: 349-353.

CAPÍTULO III: PROTISTA ESPOROGÉNICO



INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existe una gran variedad de microorganismo esporogénicos simbioses, parásitos o patógenos de insectos. Alguno de los grupos más estudiados están representados por las especies de la Familia Nephridiophagidae Sprague son protistas esporogénicos simbioses de los túbulos de Malpighi de los insectos y se han descripto principalmente en los Ordenes de Orthoptera, Coleoptera y Blattodea (Lange, 1993; Hausmann *et al.*, 2003). Es un grupo de filogenia incierta y se cree que están relacionados (con débil apoyo) con los hongos zygomycetes (Wylezich *et al.*, 2004). *Nephridiophaga* sp parasitan los túbulos de Malpighi de las cucarachas, algunos ejemplos son, *N. blattellae* (Crawley) en *B. germánica* y *N. periplanetae* (Lutz & Splendore) en *P. americana*, *P. brunnea* y *B. orientalis* (Radek & Herth, 1999; Lange, 1991, 1993). Los Microsporidios Balbiani 1882, son parásitos eucariotas intracelulares obligados de diferentes grupos de animales como por ejemplo los humanos, los insectos e incluso son parásitos de Protistas (Lee *et al.*, 2008; Scheid 2007); con mitocondrias altamente reducidas a mitosomas; esporas con pared interior de quitina y la pared exterior proteica; sin cinetosomas, centriolos o cilios; placa centrosomal; los esporos con extrusión especializada a través de un tubo polar que penetra en las células del hospedador; la reproducción es sexual, asexual o ambas (Adl *et al.*, 2012). Varios estudios realizados sugieren que los microsporidios comparten un ancestro común con los hongos (Lee *et al.*, 2008; Adl *et al.*, 2012). Como consecuencia, no está claro si los microsporidios evolucionaron de un linaje de hongos específicos, o si son un grupo hermano de todos los hongos. Los microsporidios son responsables de importantes fluctuaciones en poblacionales en varios insectos terrestres (Lange, 1996); también presentan efectos subletales, como disminución de la fecundidad y dificultades en el apareamiento y reducción de longevidad (Lange, 1996). En la República Argentina hay una amplia lista de trabajos que describen a los microsporidios presentes en insectos. Por ejemplo, microsporidios presentes en dípteros (García *et al.*, 1994,1999; Micieli *et al.*, 2006, 2009); en tucuras y langostas (Lange *et al.*,1998, 2000, 2003, 2008). El ciclo de vida de muchos de los microsporidios, considerados enemigos naturales para las cucarachas son desconocidos (Suiter, 1997).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue registrar y caracterizar el hallazgo de un protista esporogénico presente en la cucaracha oriental, *Blatta orientalis*, recolectada en la ciudad de La Plata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cucarachas fueron disecadas como se describió en el capítulo I (p. 46). El tubo digestivo, tubos de Malpighi y ovarios del insecto fueron retirados y colocados cada uno en una caja de Petri con solución salina (0,85% Cl Na). Se realizó una incisión longitudinal en el intestino medio, ciegos y se realizaron preparados en fresco con solución salina (0,85% Cl Na). Las fotografías fueron tomadas usando un microscopio óptico (MO) Olympus Bx41 con cámara incorporada Lumenera Infinity 1, con contraste de fases (x400; x1000); se utilizó para el análisis de las imágenes capturadas el software libre IMAGE J. Las mediciones realizadas a los esporos se expresaron en micrómetros (μm), estableciéndose la media y la desviación estándar, con los valores máximos y mínimos entre paréntesis.

RESULTADOS

Descripción de un Protista esporogénico en *Blatta orientalis*

La disección realizada puso de manifiesto que el sitio de desarrollo del eucariota unicelular esporogénico fue en el epitelio de los ciegos intestinales; se observaron signos patológicos generando la hipertrofia del ciego de color opaco debido a la gran cantidad de masas de esporos (Fig. 1a) y con pequeños puntos de melanización a lo largo del tubo intestinal.

La forma y tamaño de los esporos fue muy variable, desde reniformes a ovoides; sin embargo, la mayoría presentaba forma elipsoidal a elipsoidal plano-convexo (Figs. 1 b y 2). Los esporos midieron (N=30) de largo $4,8 \pm 0,7$ (3-5,9) μm , de ancho $2,5 \pm 0,4$ (2,1-3,4) μm y mostraron una intensa refringencia (Fig. 2 b-c). Entre los esporos normales se observó una gran cantidad de esporos malformados que variaron en forma y tamaño desde ovoides gigantes a triangulares pequeños, llamados también teratoesporos (Figs. 1 b; 2 d-f).

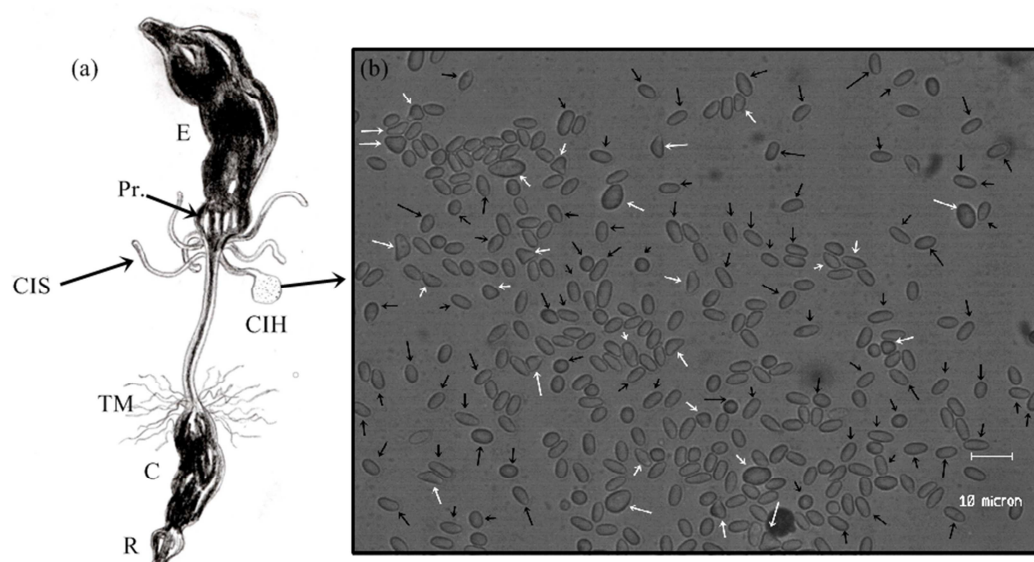


Figura 1. (a) esquema del tubo intestinal de cucarachas, donde se observan los ciegos intestinales sanos (CIS) e hipertrofiados (CIH), estómago (E), proventrículo (Pr.), túbulos de Malpighi (TM), colon (C) y recto (R). (b) las flechas negras indican los esporos normales donde se observan las diferentes formas, las flechas blancas indican los teratoesporos.

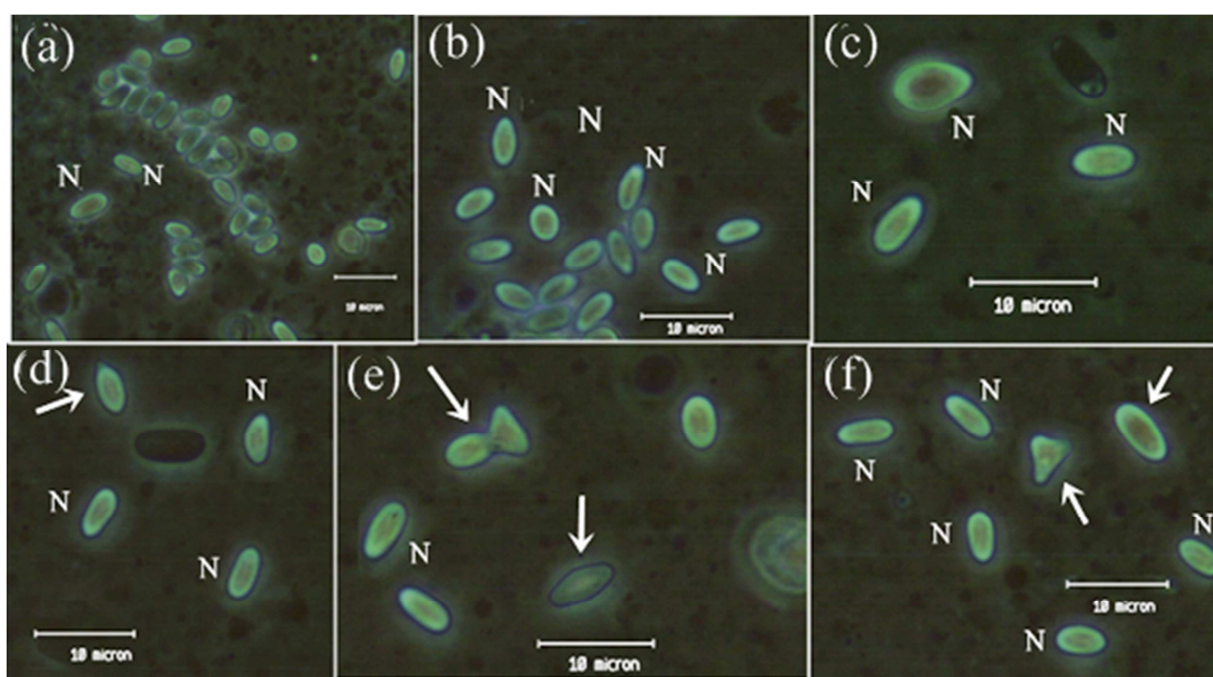


Figura 2. (a - f) esporos observados al MO con contraste de fases. Se observan las diferentes formas y tamaños de los esporos (N). (d - f) las flechas blancas marcan las esporos anormales o teratoesporos.

DISCUSIÓN

Se trató a este microorganismo como un Protista unicelular esporogénico debido a la falta de caracteres diagnósticos de Microsporidia y a que existen otros grupos de simbioses eucariotas esporogénicos similares bajo microscopía óptica (Plischuk & Lange, 2011; Solter *et al.*, 2012). Sin embargo, la morfología general de los esporos maduros, la localización de la infección en los ciegos intestinales, la patología observada en los ciegos y la identidad de la especie hospedador sugiere que podría tratarse de la especie *Pleistophora kudoi*. (Sprague & Ramsey), aunque son necesarios estudios de estados de desarrollo, extrusión del filamento polar y datos de secuenciación que permitan aclarar la identidad de este Protista esporogénico. Sprague & Ramsey (1942) describen la patología para *P. kudoi* en *B. orientalis*, a través del examen de los ciegos intestinales. Si el ciego está infectado resulta estar distendido con líquido y grandes masas opacas de esporas se ven a menudo en el revestimiento epitelial. *P. kudoi*, genera un daño considerable a las células epiteliales que recubren los ciegos intestinales e intestino medio. Las células fuertemente infectadas se encuentran a menudo hipertrofiadas. El citoplasma puede llegar a estar casi completamente sustituido por esporas y la membrana celular distendida forma un saco que se extiende mucho más allá de las células vecinas llegando a parecerse a un proceso de gemación. Los extremos distales de estas células hipertrofiadas a menudo parecen romperse y pasar hacia fuera en el lumen. Este fenómeno puede ser debido a un proceso mecánico, causado por el gran número de esporas contenidas en el interior de la célula. Los núcleos nunca muestran ninguna reacción específica al parasitismo, los núcleos se degeneran solo en las células que se desprenden del epitelio. Otras células que están parasitadas contienen un número menor de esporas, pero no están hipertrofiadas (Sprague & Ramsey, 1942).

Sprague & Ramsey (1942) describen las medidas de los esporos maduros de *P. kudoi* de alrededor de 3,2 μm de largo por 1,75 μm de ancho, con una alta refracción, de forma reniforme, piriforme u ovoide, predominando éstos últimos, y de sección transversal circular. Sin embargo aclaran que existe una gran variación en el tamaño, aunque la mayoría son de aproximadamente 3 μm de longitud, unos pocos alcanzan los 5 μm . Estos resultados coinciden con las formas y medidas obtenidas en nuestro estudio, excepto que el promedio del largo y ancho de los esporos en nuestro caso es levemente

mayor. Hasta el presente los hallazgos de microsporidios en cucarachas son escasos. Sprague (1977) menciona a *P. blattae* y *P. kudo*i en *B. orientalis*; y Narasimhamurti & Kalavati (1978) describen a *P. blattae* parasitando las células de los túbulos de Malpighi en *B. germanica*. Hasta nuestro conocimiento no se han hallado nuevas especies de microsporidios en el mundo parasitando cucarachas.

Junto con los esporos normales detectados en *B. orientalis*, detectamos una gran cantidad de esporos malformados que variaron en forma y tamaño desde ovoides gigantes a triangulares pequeños, se observaron pequeños puntos de melanización a lo largo del tubo intestinal. En la bibliografía se citan varios trabajos donde se han detectado esporos triangulares entre los esporos normales. La Producción esporádica de esporas gigantes o malformadas no es poco común entre los microsporidios. Este fenómeno fue observado en microsporidios que infectan insectos como lepidópteros (Solter *et al.*, 1997), himenópteros (Knell *et al.*, 1977) y ortópteros (Henry and Oma, 1981). La formación de esporas atípicas también se produce en huéspedes no específicos (Solter *et al.*, 1997). Henry & Oma (1981) mencionan formas gigantes y triangulares entre las esporas de *Paranosema* (*Nosema*) *locustae* en saltamontes del género *Melanoplus*. Tokarev *et al.* (2007) realizaron infecciones experimentales con *P. locustae* y *P. grylli*, infectando a *Locusta migratoria* y *Gryllus bimaculatus*, respectivamente. Estos microsporidios infectaron el cuerpo graso de sus respectivos hospedadores e indujeron la formación de "nódulos", o depósitos de melanina alrededor de las células fuertemente infectadas (Tokarev & Sokolova, 2005), fácilmente visible como puntos parduscos contra el tejido adiposo infectado de color blanco lechoso. Tokarev *et al.* (2007), demostraron que el número de esporos teratoideos atípicos aumentó significativamente en los sitios de tejido infectado melanizado, y presumen, que la esporogonia teratoidea está mediada por melanización e indican que existe un efecto de deterioro de los metabolitos de la melanina sobre la morfogénesis de los esporos. Esto puede ser considerado como un mecanismo de defensa contra la infección de microsporidio (Aunque no hay datos que demuestren la eficacia de esta reacción de defensa) Tokarev *et al.* (2007).

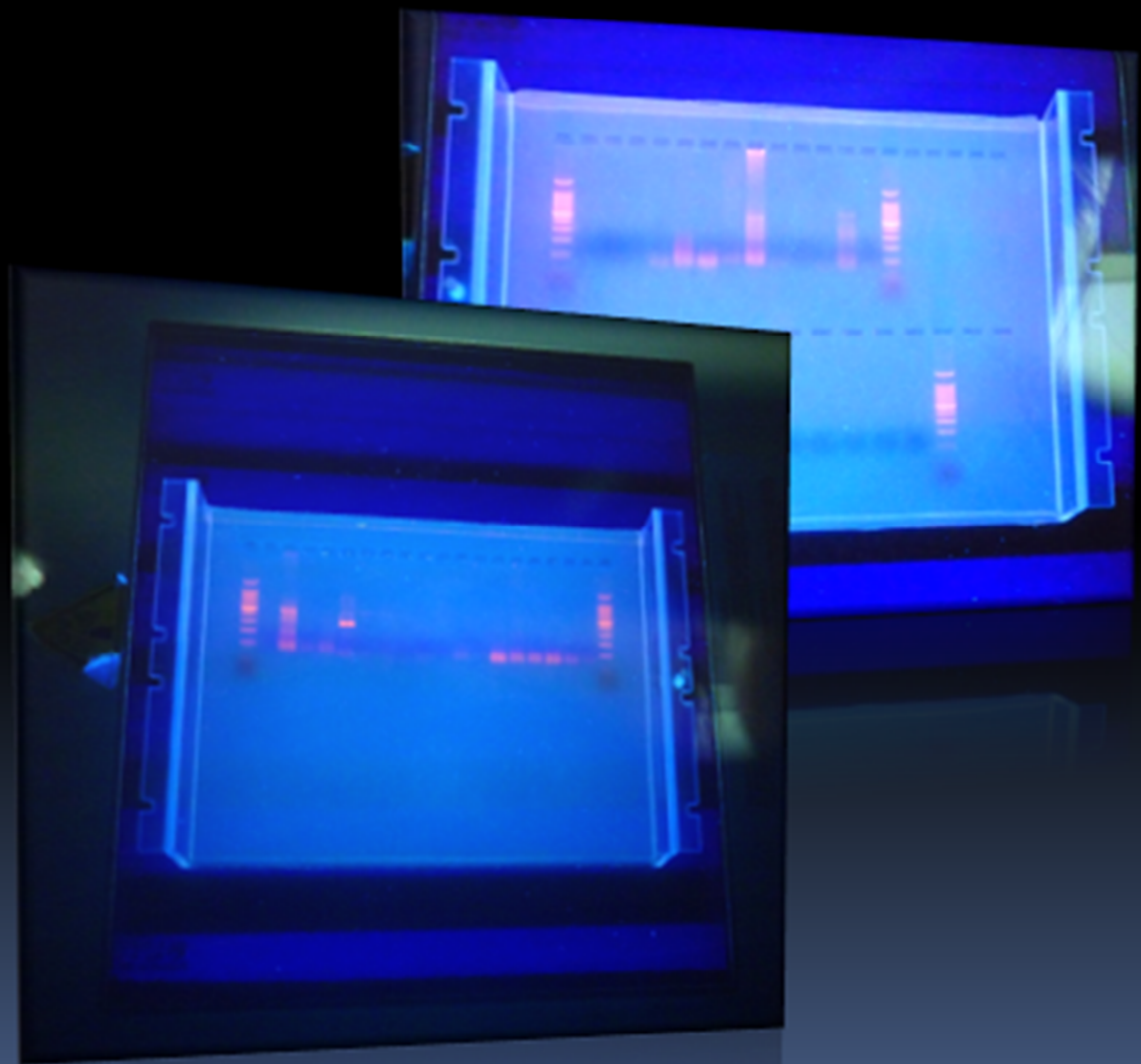
BIBLIOGRAFÍA

- Adl S.M., Simpson A.G.B., Lane C.E., Lukeš J., Bass D., Bowser S.S., Brown M.W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., et al. (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59:429-493.
- García J.J. & Becnel J.J. (1994). Eight new species of microsporidia (Microspora) from Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.* 64: 243 – 252.
- García J.J. & Micieli M.V. (1999). Potencial de los microsporidios (Microspora) para el control de mosquitos (Diptera: Culicidae) en la Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 58(1-2): 34-41.
- Hausmann, K., N. Hülsmann & R. Radek. 2003. *Protistology*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Henry J.E., Oma E.A., (1981). Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets. In: Burges, H.D. (Ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980*. Academic Press, New York, pp. 573–586.
- Knell J.D., Allen G.E., Hazard E.I. (1977). Light and Electron-Microscope Study of *Thelohania solenopsae* n. sp. (Microsporidia-Protozoa) in Red Imported Fire Ant, *Solenopsis invicta*. *J. Invertebr. Pathol.* 29, 192–200
- Lange C.E. (1991). Ultraestructura de los plasmodios de *Coelosporidium periplanetae* (Lutz y Splendore) (Protoctista: Protozoa): interacción con las células del hospedador y formación de esporoblastos. *Neotropica* 37: 127-136
- Lange C.E. (1993). Unclassified protists of arthropods: the ultrastructure of *Nephridiophaga periplanetae* (Lutz & Splendore, 1903) n. comb., and the affinities of the Nephridiophagidae to other protists. *J. Euk. Microbiol.* 40:689–700.
- Lange C. E. (1996). Protistas patógenos de insectos terrestres. En *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga*. . Lecuona, R. E. (Ed.), M. Mas, Buenos Aires Argentina.
- Lange C. E. (2003). Niveles de esporulación experimentales y naturales del agente de biocontrol *Nosema locustae* (Protozoa. Microspora) en especies de tucuras y langostas (Orthoptera: Acridoidea) de la Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argen.* 62(1-2): 15-22.

- Lange C.E. & Azzaro F.G. (2008). New case of long-term persistence of *Paranosema locustae* (Microsporidia) in melanopline grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae) of Argentina. J. Invertebr. Pathol.99: 357-359.
- Lange C.E., Sanchez NE and Wittenstein E. (2000). Effects of the pathogen *Nosema locustae* (Protozoa: Microspora) on mortality and development of nymphs of the South American locust, *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae). J. Orthop.9: 77-80.
- Lange C.E., Wittenstein E. and Sanchez N.E. (1998). Susceptibilidad de la langosta *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae) a *Nosema locustae* (Protozoa: Microspora), en laboratorio. Revista Fac. Agron. Univ. Nac. La Plata 103(2): 185-189.
- Lee S.C., Corradi N., Byrnes E.J. III., TorresMartinez S., Dietrich F.S., Keeling P.J., Heitman J. (2008). Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. Curr. Biol. 18(21):1675–1679.
- Micieli M.V., García J.J and Andreadis T.G. (2009). Factors affecting horizontal transmission of the microsporidium *Amblyospora albifasciati* to its intermediate copepod host *Mesocyclops annulatus*. J. Invertebr. Pathol. 101: 228-233
- Micieli M.V, Marti G.A., Garcia J.J., Tranchida M.C and Becnel J.J. (2006). Epizootiological studies of *Amblyospora camposi* (Microsporidia: Amblyosporidae) in natural populations of their host, *Culex renatoi* (Diptera: Culicidae) and *Paracyclops fimbriatus fimbriatus* (Copepoda: Cyclopoidea). J. Invertebr. Pathol.94: 31-37.
- Narasimhamurti C.C. & Kalavati C. (1978). A new Microsporidian, *Pleistophora blattellae* sp. n. from the Malpighian tubules of *Blattella germanica*. Acta Protozool. Vol.17 (3) 461-466.
- Plischuk, S. & Lange, C. E. (2011). Registro de *Nephridiophaga* sp. (Protista: Nephridiophagidae) en *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) del Sur de la región Pampeana. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 70: 357-361.
- Radek R, Herth W. 1999. Ultrastructural investigation of the spore forming protest *Nephridiophaga blattellae* in the Malpighian tubules of the German cockroach *Blattella germanica*. Parasitol Res. 85(3):216-31.

- Scheid P (2007) Mechanism of intrusion of a microsporidian-like organism into the nucleus of host amoebae (*Vannella* sp.) isolated from a keratitis patient. *Parasitology Research*. 101(4):1097-102
- Solter L.F., Becnel J.J. & Vávra J. (2012). Research methods for entomopathogenic microsporidia and other protists. In: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Lacey L. (eds). Chapter XI. Pp. 329-367.
- Solter L.F., Maddox J.V., McManus M.L. (1997). Host specificity of microsporidia (Protista: Microspora) from European populations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) to indigenous North American Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 69, 135–150.
- Sprague V. (1977). Classification and phylogeny of Microsporide p1-335. En *Comparative Pathobiology* Vol. 2. Edited by Lee A. Bullat, Jr. and Thomas C. Cheng.
- Sprague V. & Ramsey J. 1942. Further observations on *Pleistophora kudo*, a microsporidian of the cockroach. *J. Parasitol.* Vol. 28 (5): 399-406.
- Suiter D.R. (1997). Biological suppression of synanthropic cockroaches. *J. Agric. Entomol.* vol 14. Nro 3: 259-270.
- Tokarev Y.S., Sokolova Y.Y. (2005). Cellular immune reactions of orthopteran insect host to microsporidia. *Folia Parasitol.* 52, 12–13A.
- Tokarev Y.S., Sokolova Y.Y., Entzeroth R. (2007). Microsporidia insect host interactions: Teratoid sporogony at the sites of host tissue melanization. *J. Invertebr. Pathol.* 94 : 70–73.
- Wylezich C., Radek R. and Schlegel M. (2004). Phylogenetic analysis of the 18S rRNA identifies the parasitic Protist *Nephridiophaga blattellae* (Nephridiophagidae) as a representative of the Zygomycota (Fungi). *Denisia*, 13, 435:442.

CAPÍTULO IV: IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO *WOLBACHIA* EN CUCARACHAS



INTRODUCCIÓN

El género *Wolbachia* está integrado por bacterias gram-negativas intracelulares obligadas de transmisión maternal (= vertical) que infectan a artrópodos y nematodos (Werren *et al.*, 1995b). Este género pertenece a la familia *Anaplasmataceae*, orden *Rickettsiales*, subdivisión $\alpha 2$ de la clase *Proteobacteria* (Rogriguero, 2013). *Wolbachia* se asocia en los artrópodos, principalmente en insectos, con la incompatibilidad citoplasmática, partenogénesis y feminización (Charlat *et al.*, 2003). Se las considera parásitos reproductivos ya que en los artrópodos se localizan principalmente en las gónadas y son capaces de inducir alteraciones en la reproducción (Werren *et al.*, 1995b). Se comprobó la presencia de *Wolbachia* al menos en el 17% de los insectos neotropicales (Werren *et al.*, 1995a). Fue detectada en los principales órdenes de insectos, incluyendo Coleoptera, Diptera, Hemiptera/Homoptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Orthoptera (Rogriguero, 2013). *Wolbachia* se ha detectado en cucarachas en *Blattella* sp. y *Supella longipalpa* (Vaishampayan *et al.*, 2007), a través del análisis molecular de los genes *wsp*, *ftsZ* y 16S; y se detectó en las ootecas de *S. longipalpa* (Gibson & Hunter, 2009). Actualmente, existe muy poca información de la presencia de esta bacteria en cucarachas (Vaishampayan *et al.*, 2007; Gibson & Hunter, 2009) y se desconoce la función que cumplen ya que no se han determinados sus efectos en las cucarachas y su posible utilidad en el control biológico.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue identificar la presencia de la bacteria endosimbionte *Wolbachia* en cucarachas recolectadas en la ciudad de La Plata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de *Wolbachia* sp. por medio de técnicas moleculares

Cinco machos y cinco hembras, de cada especie (*P. fuliginosa*, *P. americana*, *B. germanica*, *B. dubia* y *P. nivea*), fueron recolectados en la ciudad de La Plata como se describe en el capítulo I (p.41). Las cucarachas fueron disecadas como se describió en el capítulo I (p.46).

Extracción del ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico

Se realizó la extracción de las gónadas (asociadas a una pequeña cantidad de cuerpo graso) de machos y hembras, de las cucarachas recolectadas. Los ovarios y testículos fueron colocados individualmente en un tubo de microcentrífuga tipo Eppendorff (1500 *ul*) con 500 *ul* de buffer STE (Anexo). Se agitó y centrifugó a 6.000 G durante 2 minutos. El “pellet” o material sedimentado, se resuspendió en 200 μ l de buffer STE más 4 μ l de proteinasa K (10 ng/ml) (ver Anexo). Las muestras se homogenizaron con una varilla de plástico y se incubaron a 56° C por 1 hora en un baño termostatzado. Luego se incubaron durante 5 minutos en agua hirviendo para inactivar la proteinasa K. Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 G durante 10 minutos, en una microcentrífuga. El sobrenadante (SN) obtenido para la extracción de ADN fue guardado en freezer a -20 °C hasta ser utilizado.

Protocolos para la extracción de ADN: se probaron 2 protocolos

Protocolo 1: en un tubo de microcentrífuga tipo Eppendorff se colocaron 50 μ l del sobrenadante, obtenido en el paso anterior, con 150 μ l de la Matriz BioRad (InstaGene™), las muestras se incubaron a 56° C durante 15 minutos y fueron homogeneizadas con vortex durante 10 segundos. Luego se incubaron durante 8 minutos en agua hirviendo para inactivar la matriz. Se sometieron nuevamente a agitación en vortex, durante 10 segundos. Se centrifugó a 9.000 G durante 2 minutos. El sobrenadante, que contiene el ADN, fue transferido a un nuevo tubo y guardado en freezer a - 20 °C hasta ser utilizado.

Protocolo 2: 100 *ul* del sobrenadante (SN) se mezclaron con 60 *ul* de ClNa (5M) (ver Anexo), las muestras se agitaron y centrifugaron a 10.000 G durante 15 minutos. El sobrenadante fue retirado y trasladado a un nuevo tubo, donde se agregaron 160 *ul* de alcohol isopropanol (a igual volumen que el sobrenadante obtenido); se agitó en vortex 10 segundos e incubó a - 20 °C durante la noche. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 G durante 15 minutos. Se descartó todo el líquido del sobrenadante, y al “pellet”, se le agregaron 300 μ l de etanol 70° (-20°C) para lavarlo. Se centrifugó a 10.000 G durante 15 minutos. El sobrenadante se descartó y se dejó secar el “pellet” en estufa a 37 °C

durante 5 minutos. Por último el “pellet” se resuspendió en 50 µl de buffer TE (ver anexo) y se guardó en freezer a – 20 °C hasta ser utilizado.

Cuantificación del ADN

Para confirmar la extracción del ADN y comparar los protocolos (1) y (2), ocho muestras de ovario y testículo se dividieron en 2 y se realizó la extracción del ADN (Tabla 1). Se cuantificó el ADN con un espectrofotómetro AmpliQuant AQ-07. Para la cuantificación de cada muestra fueron utilizados 10 µl del ADN, y se realizaron tres lecturas. Después de la cuantificación las muestras fueron diluidas a fin de ajustar una concentración del ADN para 5ng/µl.

Para verificar la calidad de las muestras de ADN por PCR se amplificó el gen de eucariotas 28S rDNA utilizando un cebador general: 28SF (5'- CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC-3') y 28Sr (5'- AAG AGC CGA CAT CGA AGG ATC-3'). La mezcla de la reacción fue sometida al termociclador “Mastercycler” (Eppendorf) previamente programado para 35 ciclos de 15 seg. a 94°C, 1 min. A 55°C, 2 min a 72 °C. Al final de los 35 ciclos fue realizada una extensión por 7 minutos a 72 °C (Werren et al., 1995a). Después de la amplificación las muestras fueron analizadas a través de electroforesis en un gel de agarosa 1%, coloreados con bromuro de etidio y fotografiados con una foto documentadora Digi Doc. La mezcla para PCR se preparó como se explica para los genes *wsp* y *ftsZ*.

Amplificación del ADN por PCR

La detección de *Wolbachia* se realizó a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó la amplificación de dos genes específicos de la bacteria *Wolbachia sp.* Tales genes fueron el gen *wsp*, que codifica para una proteína de la membrana externa bacteriana, los “primers” o cebadores utilizados fueron *wsp81* (5'- TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC- 3') y *wsp691R* (5'- AAA AAT TAA ACGCTA CTC CA-3') (Braig et al., 1998); y el gen *ftsZ*, que codifica para una proteína involucrada en el ciclo celular, cuyos cebadores usados fueron *ftsZ F* (5'-GTT GTC GCA AAT ACC GATGC-3') and *ftsZ R* (5'-CTT AAG TAA GCT GGT ATATC-3') (Werren et al., 1995). Para el análisis de PCR para los genes *wsp* y *ftsZ*, las reacciones de amplificación fueron preparadas en un volumen final de 20 µl, conteniendo 4 µl de buffer (Invitrogen Life Technologies 200 mM Tris- HCl pH 8,4, 500mM KCl, 10x

concentrado); 0,4 µl de dNTP (Invitrogen Life Technologies 2,5 mM); primers forward (cebador hacia adelante) y reverse (cebador reverso) 1,6 µl (Invitrogen Life Technologies 10 pmol/µl); 0,4 µl de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies 50 mM); 0,2 µl de Taq ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies 5 U/µl); muestra de ADN 1 µl (5 ng/µl), agua libre de nucleasa 12,4 µl. La mezcla de la reacción fue sometida al termociclador “Mastercycler” (Eppendorf) previamente programado para 35 ciclos después de la desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C. Cada ciclo de amplificación fue constituido de tres etapas: la primera de desnaturalización (95 °C, 1 minuto); la segunda de hibridación (55 °C, 1 minuto); y la tercera etapa de extensión (72 °C, 1min.). Al final de los 35 ciclos fue realizada una extensión por 10 minutos a 72 °C. Después de la amplificación las muestras fueron analizadas a través de electroforesis en un gel de agarosa 1%. Los geles fueron coloreados con bromuro de etidio y fotografiados con una foto documentadora Digi Doc.

Para este estudio contamos con un control positivo del ADN de *Wolbachia* sp., obtenido del parasitoide *Spalangia cameroni*, enviado por el Dr. Neil Sanscrainte (U.S. Department of Agriculture, Mosquito and Fly Research Unit, Gainesville, Florida, USA).

RESULTADOS

Cuantificación del ADN

Los datos obtenidos con el espectrofotómetro permitieron determinar que la mayoría de las muestras obtenidas del protocolo de extracción (2) obtuvieron mayor cantidad de ADN y se encontraron dentro del rango de la pureza del ADN (Tabla 1), es decir fue más efectivo que el protocolo (1). Sin embargo, ambos protocolos extrajeron una concentración de ADN suficientemente grande como para realizar la amplificación por PCR, ya que la cantidad mínima de ADN necesaria para la PCR es de 5 ng/µl. Fue necesario realizar diluciones del ADN original antes de amplificar por PCR.

Tabla 1. Cuantificación de las muestras de ADN realizadas con el espectrofotómetro

Número	Muestras de ADN	Protocolos de extracción de ADN			
		1	Pureza: entre 1,8-2	2	Pureza: entre 1,8-2
1	DNA <i>Periplaneta fuliginosa</i> ♂	43,021	0,9	126,3	1,8
2	DNA <i>Periplaneta fuliginosa</i> ♀	52,5	0,7	40,1	0,6
3	DNA <i>Blaptica dubia</i> ♂	28,9	0,6	74,6	1
4	DNA <i>Blaptica dubia</i> ♀	52,4	0,6	15,07	0,4
5	DNA <i>Panchlora nivea</i> ♂	10,315	1	15,96	1,5
6	DNA <i>Panchlora nivea</i> ♀	6,6	0,9	3,5	1,7
7	DNA <i>Battella germanica</i> ♂	15,217	0,6	53,4	1,6
8	DNA <i>Blattella germanica</i> ♀	25,217	0,7	31,3	1,6

Se amplificaron con PCR los fragmentos que corresponden al gen 28S, en ambos protocolos, esto nos permitió verificar la calidad del ADN, ya que si existía ADN de las cucarachas el gen 28S debería amplificar una banda de entre 500 a 600 pb; en nuestro caso amplificó 600 pb. En conclusión, en ambos protocolos fue posible evaluar la cantidad del ADN, a través del espectrofotómetro, y la calidad del ADN a través de la capacidad de amplificación del gen 28 S por PCR.

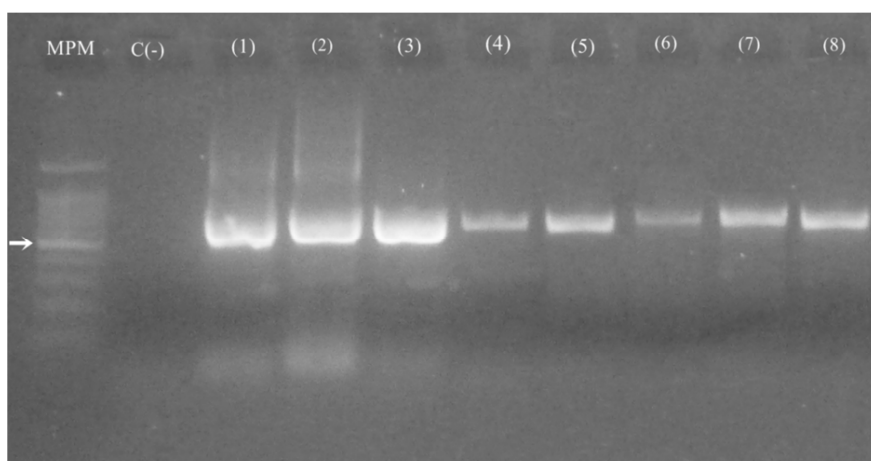


Figura 1. Perfil electroforético del producto de amplificación del gen 28S realizado con el protocolo 1. MPM= marcador de peso molecular. C (-)= control negativo. ADN de *P. fuliginosa* (1) ♂ y (2) ♀. ADN de *B. dubia* (3) ♂ y (4) ♀. ADN de *P. nivea* (5) ♂ y (6) ♀. ADN de *B. germanica* (7) ♂ y (8) ♀. La flecha blanca marca los 500pb.

En la Fig. 1 las muestras de ADN (1) a (8) amplificaron la banda de 600 pb, en las muestras (1), (2) y (3) al tener exceso de ADN se observa una banda muy gruesa y acompañada por un chorreado de ADN.

Visualización del resultado por PCR de los genes de *Wolbachia* sp.:

Se preparó un gel de agarosa al 1% en Buffer de electroforesis TBE (Anexo) y Bromuro de Etidio (0,1 µl/ml). Se tomaron 5 µl del producto amplificado, a los que se añadieron 1 µl de buffer de siembra. En el primer pocillo del gel se colocaron 3 µl de un marcador de tamaños 100-1500 pares de bases (pb) DNA Ladder (Promega).

Se amplificó el gen *wsp* de *Wolbachia* del ADN extraído de un macho de *B. dubia* y una hembra de *P. nivea*, el fragmento obtenido tiene aproximadamente de 650-700 pb (Fig. 2), coincidiendo con el control positivo y la bibliografía (Vaishampayan *et al.*, 2007; Baldo *et al.*, 2006). Si bien, no se pudo amplificar el gen *ftsZ* (900 pb.) en las muestras procesadas, si amplificó el control positivo (Fig. 3). Sin embargo, la amplificación del gen *wsp* sugiere que estas muestras contienen el endosimbionte *Wolbachia*.

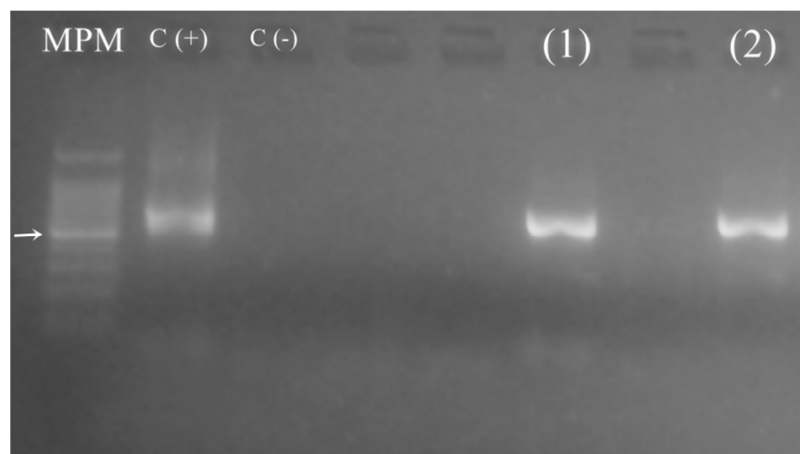


Figura 2. Perfil electroforético del producto de amplificación del gen *wsp*. MPM= marcador de peso molecular. C (+) = control positivo. C (-)= control negativo. (1) ADN de testículo de *Blaptica dubia*. (2) ADN de ovario de *Panchlora nivea*. La flecha blanca marca los 500pb.

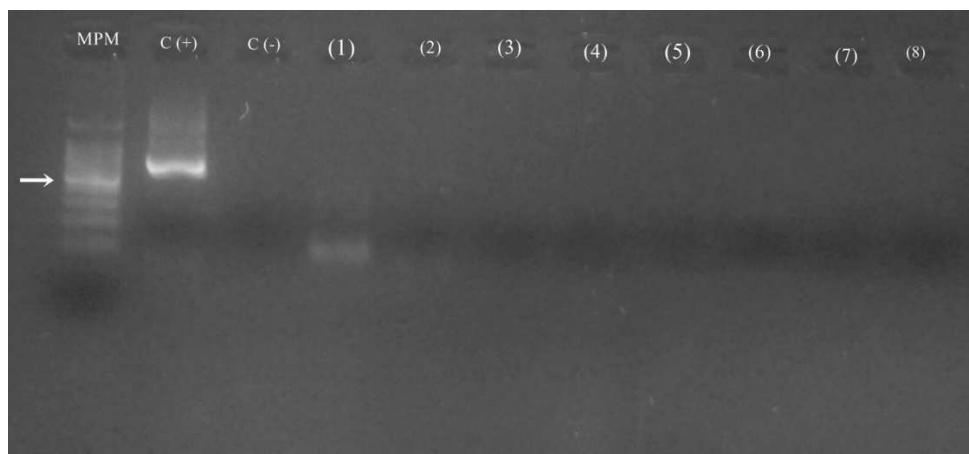


Figura 3. Perfil electroforético del producto de amplificación del gen *ftsZ*. MPM= marcador de peso molecular. C (+) = control positivo. C (-)= control negativo. Muestras de ADN de gónadas de diferentes especies de cucarachas (1-8). La flecha blanca marca los 500pb.

DISCUSIÓN

En la actualidad es ampliamente reconocido que los microorganismos simbioses desempeñan un papel crucial en la ecología y la evolución de sus hospedadores, y el descubrimiento de *Wolbachia* en cucarachas ayudará en la comprensión de la filogenia y diversidad de *Wolbachia* (Vaishampayan *et al.*, 2007). El género *Wolbachia* es genéticamente muy diverso y se divide en ocho "supergrupos" (A a H) (Lo *et al.*, 2007). Las cucarachas y las hormigas león (Neuroptera: Myrmeleontidae) pertenecen al supergrupo F (Dunn *et al.*, 2005; Vaishampayan *et al.*, 2007). En nuestro trabajo, la presencia de *Wolbachia* en las cucarachas, *B. dubia* y *P. nivea*, fue comprobada por amplificación del gen *wsp*. Este sería el primer registro de esta bacteria endosimbionte en las mencionadas especies de cucarachas. En la actualidad hay un total de dos especies de cucarachas donde se ha detectado *Wolbachia*; *Blattella sp.* y *S. longipalapa* (Vaishampayan *et al.*, 2007; Gibson & Hunter, 2009). Si bien estos resultados son prometedores, no se pudo amplificar el gen *ftsZ*. Sin embargo, hay varios estudios que describen que cuando utilizaron diferentes cebadores para amplificar el gen *ftsZ* del ADN de *Wolbachia* por un método estándar de PCR a partir de ácaros (Acari: Tetranychidae), en los ensayos no pudieron detectar ADN de *Wolbachia* y los resultados produjeron un falso negativo (Johanowicz & Hoy, 1998; Hong *et al.*, 2002). Hong *et al.* (2002), probaron la sensibilidad de diferentes primers en la identificación de *Wolbachia*, y determinaron que los cebadores *wsp* y 16S eran los más adecuados para la detección

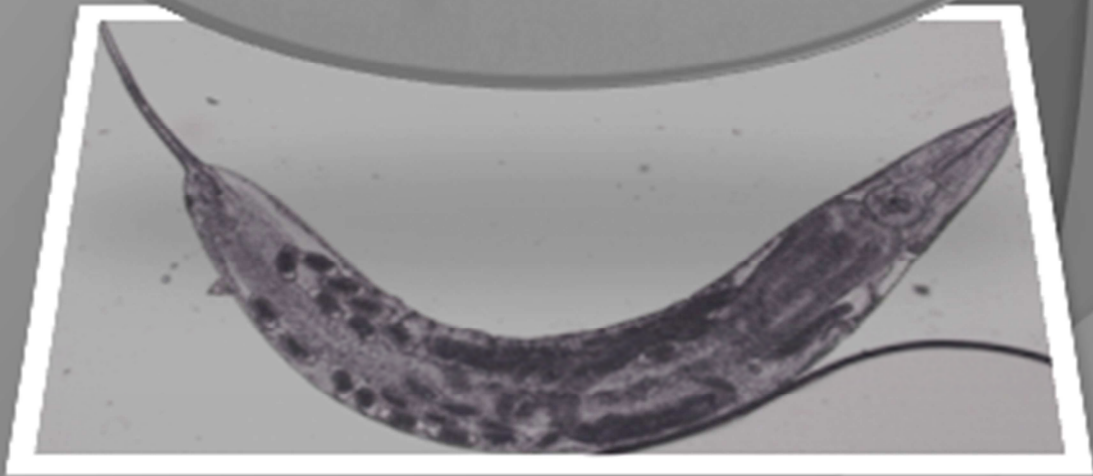
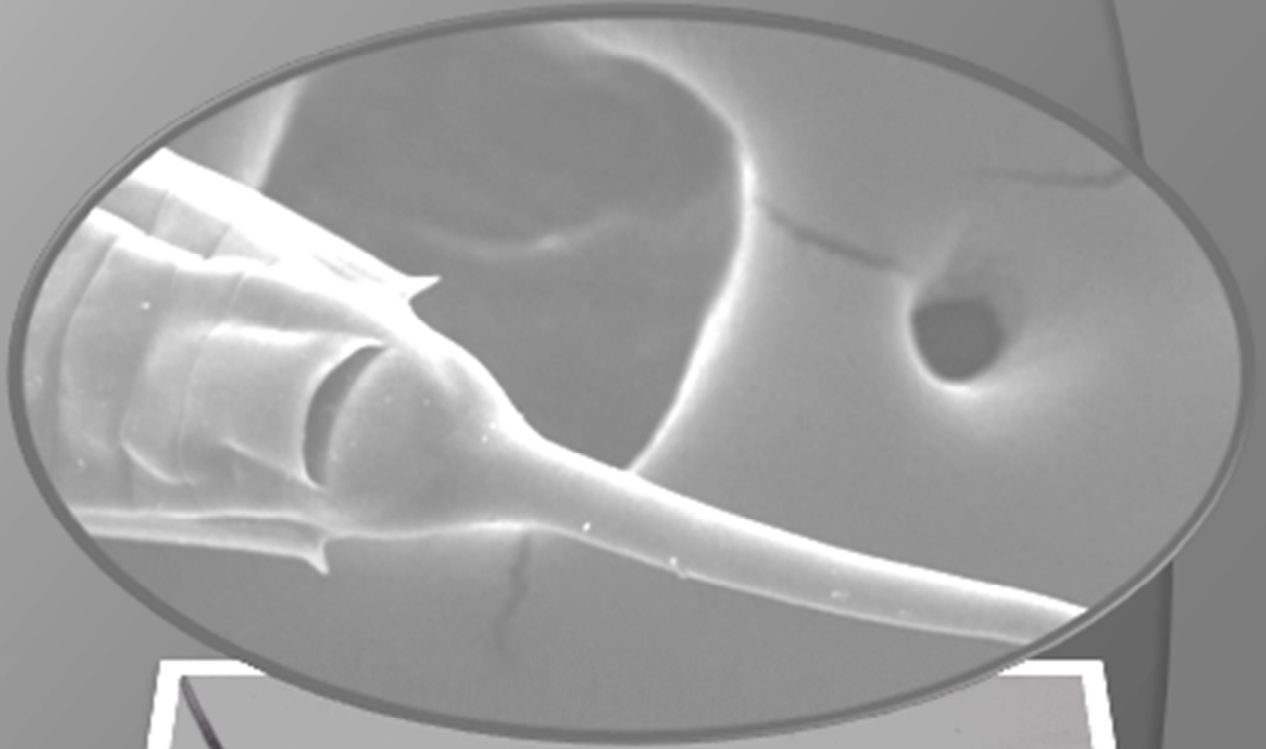
de *Wolbachia* en las arañuelas o ácaros arañas. Y los primers *ftsZ* fueron los menos sensibles. Esto podría explicar porque en nuestro estudio amplificó el control positivo y no amplificó el gen *ftsZ* de la bacteria presente en cucarachas. Es posible que necesitemos realizar técnicas moleculares con mayor sensibilidad, sin embargo, se pueden utilizar los primers alternativos al gen *ftsZ*, utilizados en el trabajo de Baldo *et al.* (2006), para complementar los resultados obtenidos por la amplificación del gen *wsp*, y poder en un futuro realizar la secuenciación de los fragmentos y determinar la filogenia de ésta bacteria.

BIBLIOGRAFÍA

- Baldo L., Dunning Hotopp J.C., Jolley K.A., Bordenstein S.R., Biber S.A., Choudhury R.R., Hayashi C., Maiden M.C., Tettelin H., Werren J.H. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 72 (11) 7098-7110.
- Braig H.R., Zhou W., Dobson S., O'Neill S.L. (1998). Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. J. Bacteriol. 180, 2373–2378.
- Charlat S., Hurst G.D.D., Merçot H. (2003). Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. Trends. Genet. 19(4): 217-223.
- Dunn A.K. & Stabb E.V. (2005). Culture-independent characterization of the microbiota of the ant lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). Appl. Environ. Microbiol. 71:8784–8794.
- Gibson C.M. & Hunter M.S. (2009). Inherited Fungal and Bacterial Endosymbionts of a Parasitic Wasp and Its Cockroach Host. Microb. Ecol. 57:542–549.
- Hong X.Y., Gotoh T., Noda H. (2002). Sensitivity comparison of PCR primers for detecting *Wolbachia* in spider mites. Appl. Entomol. Zool. 37 (3): 379–383.
- Johanowicz D.L. & Hoy M.A. (1996). *Wolbachia* in a predator- prey system: 16S ribosomal DNA analysis of twophytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and their prey (Acari: Tetranychidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 89: 435–441
- Lo N., Paraskevopoulos C., Bourtzis K., O'Neill S.L., Werren J.H., Bordenstein S.R. and Bandi C. (2007). Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:654–657.

- Rodriguero, M. S. 2013. *Wolbachia*, una pandemia con posibilidades. Rev. Soc. Entomol. Argent. 72 (3-4): 117-137.
- Vaishampayan P.A., Dhotre D.P., Gupta R.P., Lalwani P., Ghate H., Patole M.S. and Shouche Y.S. (2007). Molecular evidence and phylogenetic affiliations of *Wolbachia* in cockroaches. Mol. Phyl. Evol. 44:1346–1351.
- Werren J.H., Windsor D. and Guo L.R. (1995a). Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proc. R. Soc. Lond. B. 262: 197-204.
- Werren J.H.; Zhang W. and Guo L.R. (1995b). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*-reproductive parasites of arthropods. Proc. R. Soc. Lond. B. 261: 55-63.

CAPÍTULO V: NEMATODOS DE CUCARACHAS



INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la terminología aceptada actualmente, los nematodos entomofílicos comprenden especies que tienen afinidad con insectos y que - de una u otra manera - se vinculan con ellos, pudiendo ser de vida libre o parásitos (Stock, 2002). Existen dos subgrupos de importancia en función de la relación hospedador-nematodo existente: entomo-patógenos y entomoparásitos (Doucet *et al.*, 2008).

Los Nematodos entomopatógenos son aquellos que presentan una asociación mutualista con bacterias simbios y que en conjunto ocasionan la muerte del insecto que infectan. Por ejemplo las Familias Heterorhabditidae y Steinernematidae (Poinar, 1990; Burnell & Stock, 2000). Los nematodos entomo-parásitos comprenden especies que se desarrollan a expensas del insecto, sin por eso ocasionar indefectiblemente su muerte, por ejemplo las familias Mermithidae y Thelastomatidae.

El orden Oxyurida (oxiuros) comprende a los nematodos que se encuentran en el intestino grueso de numerosos vertebrados e invertebrados. Se transmiten directamente por un huevo infectivo y tienen un ciclo de vida haplodiploide en la que se originan machos haploides a partir de huevos no fertilizados y hembras diploides surgen de huevos fertilizados (Adamson, 1989). Los oxyuridos se dividen en dos superfamilias, Oxyuroidea, que son los oxiuros que se encuentran en vertebrados y Thelastomatoidea - presentes en invertebrados principalmente en los artrópodos terrestres.

La identificación de estos nematodos se basa en la revisión del grupo de Adamson & Van Waerebeke (1992a). La superfamilia Thelastomatoidea son nematodos parásitos, comensales o saprofílicos de artrópodos terrestres. Ellos viven en el intestino grueso del hospedador y se alimentan por lo general sobre la microfauna de bacterias que se encuentra allí (Jex *et al.*, 2005). Adamson y Van Waerebeke (1992 a, b, c) divide a la superfamilia en cinco familias: Hystrignathidae Travassos, 1920 (Walton, 1927; Skrjabin *et al.*, 1966; Adamson & van Waerebeke, 1992c), que solo se ha citado en los escarabajos pasálidos; Protrelloididae Chitwood, 1932, solo se ha detectado en cucarachas; Pseudonymidae Adamson, 1989, que solo se han encontrado en los escarabajos hidrofílicos; Travassosinematidae Rao, 1958, se citó principalmente en los grillos topo y por último la familia Thelastomatidae Travassos, 1929, es la más grande

de las familias dentro de la superfamilia Thelastomatiodea, se han descrito 28 géneros (Adamson y Van Waerebeke 1992a) y Jex *et al.*, 2005 añadió tres nuevos géneros.

Durante el estudio de los nematodos parásitos de insectos en Argentina, los trabajos se centraron principalmente en la descripción de aquellos presentes en *Periplaneta americana* (L.) (Blattodea: Blattidae). En dicha cucaracha se han citado *Hammerschmidtella diesingi* (Blanco *et al.*, 2012), *Thelastoma domesticus*, *Leidynema* sp., *Blattophila* sp. y *Hammerschmidtella* sp. (Camino & Quelas, 2008; Camino *et al.*, 2012a), *H. laplatae* (Camino *et al.*, 2013b) y en *Periplaneta brunnea* Camino describe una nueva especie *H. eltalaensis* (Camino *et al.*, 2012b). *Protrellus blatta* se cita en Catamarca parasitando a *Blattella vaga* (Camino *et al.*, 2013a). Debido a que no existe información de los parásitos presentes en *Periplaneta fuliginosa* (Serville) (Blattodea: Blattidae) en Argentina, centraremos nuestro trabajo en la búsqueda de nematodos en las poblaciones de *P. fuliginosa* de la ciudad de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Ampliar el conocimiento de la diversidad de nematodos presentes en cucarachas urbanas.

Objetivos específicos:

Aislar e identificar a los nematodos parásitos de *P. fuliginosa*.

Obtener la secuencia de una región del DNAr (LSU) de dos especies de nematodos identificados por medidas morfométricas a efectos complementar los métodos diagnósticos tradicionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación y caracterización de los nematodos por medio de caracteres morfométricos

Se recolectaron ninfas y adultos de la cucaracha marrón ahumada, *P. fuliginosa* en domicilios de la ciudad de La Plata, Buenos Aires, Argentina durante los meses de julio de 2010 a septiembre de 2011 como se describe en el capítulo I. Se realizó un muestreo al azar para el hallazgo de nematodos, las cucarachas fueron recolectadas utilizando la metodología explicada previamente en el capítulo I (p. 41) y transportadas al laboratorio para su disección. Las cucarachas fueron anestesiadas con dióxido de carbono (CO₂) durante 20 segundos. La disección se realizó como se describe en el capítulo I (p. 46). Se extrajo el intestino posterior utilizando una tijera y aguja entomológica, bajo el microscopio binocular estereoscópico, con solución salina (NaCl 0,85%) para preservar la osmolaridad de los tejidos que contienen los parásitos. El intestino posterior fue colocado en una caja de Petri (100 mm diámetro) con solución salina y dividido longitudinalmente para liberar los parásitos. Los nematodos fueron recogidos utilizando un alfiler entomológico, con la punta curva, y colocados dentro de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con solución Ringer (Anexo). Los nematodos se fijaron por dos métodos. (1) El tubo de microcentrífuga conteniendo el nematodo en solución Ringer fue colocado en un baño seco a 60°C durante dos minutos. Una vez muertos, se agregó el fijador TAF (Anexo) en partes iguales (1 de Solución Ringer: 1 de fijador), luego de 48 horas fue colocado el fijador puro para preservar a los nematodos para el posterior análisis microscópico. (2) Los nematodos fueron fijados en alcohol 70° a una temperatura de 70° C y luego se introdujeron en tubos de microcentrífuga con alcohol 70°. Posteriormente, los nematodos fueron montados individualmente para su observación al microscopio. Como líquido de montaje se utilizó Glicerina-Alcohol 70° en partes iguales. Esta mezcla hizo que los ejemplares se rehidraten rápidamente y se produzca el aclaramiento para el estudio de las estructuras internas del parásito. Este tipo de preparación no es permanente. Por ello, una vez que se realizaron las medidas correspondientes, se desmontaron y se conservaron en tubos de microcentrífuga con alcohol 70°.

Las medidas fueron tomadas usando un microscopio óptico Olympus Bx41 con cámara incorporada Lumenera Infinity 1 y se utilizó para el análisis de las imágenes

capturadas el software libre IMAGE J. Los estudios para comparar las mediciones morfológicas y morfométricas de los nematodos recolectados fueron realizados utilizando las fórmulas de Mann (De Man, 1884). Las mediciones se expresan en micrómetros (μm), estableciéndose la media y la desviación estándar de la media y los valores máximos y mínimos obtenidos.

Indices de Man:

n= número de individuos.

L= longitud total del cuerpo (μm).

W= ancho máximo del cuerpo (μm).

a= longitud del cuerpo (μm) / el diámetro mayor del cuerpo (μm).

b= longitud del cuerpo (μm) / distancia del extremo anterior del cuerpo a la base del esófago (μm).

c= longitud del cuerpo (μm) / largo de la cola (μm).

V= distancia desde el extremo anterior hasta la vulva x 100/ largo del cuerpo.

Parámetros cuantitativos de las poblaciones de nematodos:

Se calcularon los siguientes índices parasitológicos según Bush *et al.* (1997):

Prevalencia: número de hospedadores infectados por una especie parásita particular, dividido por el número de total de hospedadores examinados; se expresa en porcentaje.

Intensidad: número de individuos de una especie parásita particular en un hospedador individual infectado.

Intensidad media (IM): intensidad promedio de una especie particular de parásito entre los hospedadores infectados. Se calcula como número total de parásitos/número de hospedadores infectados.

Abundancia: número de parásitos de una especies particular en o sobre un hospedador sin tener en cuenta si el hospedador está o no infectado.

Abundancia media (AM): número promedio de parásitos por hospedador examinado en una muestra (incluye a los no infectados). Se calcula como número total de parásitos/número total de hospedadores examinados.

Preparación de muestras de nematodos para microscopia de barrido (MEB):

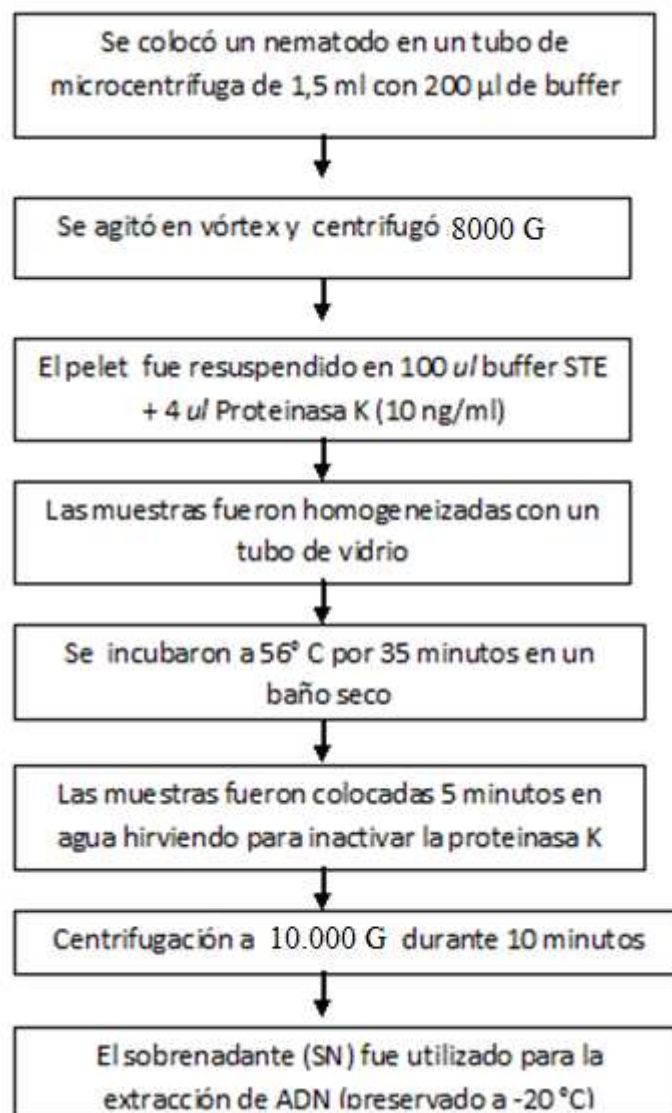
Las muestras para microscopia de barrido fueron fijadas en TAF (ver Anexo), deshidratadas en una serie crecientes de etanol. Las muestras de nematodos fueron secadas antes de ser introducidas en el microscopio, de otro modo la baja presión en el mismo causaría que el agua (y otros líquidos volátiles) se evaporen saliendo violentamente del espécimen y alterando la estructura del mismo, entre los métodos que existen para conseguirlo se encuentra el método del punto crítico en el cual el líquido pasa directamente a la fase gas.El equipo de Punto Crítico utilizado fue EMITECH, Modelo K850.Fue usado un microscopio electrónico de barrido marca Philips SEM 505 con un programa para la obtención de imágenes digitales (Digitalizador de Imagen Soft Imaging Sistem ADDA II (SIS). Las muestras fueron metalizadas en un metalizador Balzers, que por el método de “sputtering” permite realizar depósitos delgados (de un espesor aproximado a 15-20 nm) de oro para darle conductividad térmica y eléctrica a las muestras no conductoras.

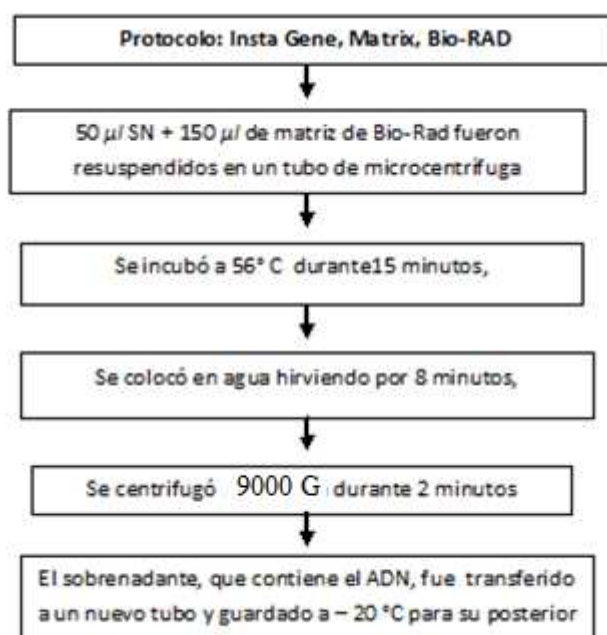
Identificación y caracterización de los nematodos por medio de técnicas moleculares

Extracción del ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico

Los nematodos fueron abundantes en este estudio y pudieron ser extraídos en el laboratorio en sus hospedadores naturales, esto es importante ya que los métodos de extracción de ADN son más susceptibles al tratar con muestras vivas, frescas y no congeladas (Dowling *et al.*, 1996). La muerte de los nematodos fue lograda por medio de calor, utilizando un baño seco a 60°C durante dos minutos en solución salina y luego se colocó etanol hasta llegar a una concentración de 70%. Todas las muestras provinieron de nematodos preservados en alcohol 70 %. El etanol conserva especímenes por la inhibición de las enzimas celulares. Este es un proceso completo e irreversible, por lo tanto las muestras fueron re-hidratadas en concentraciones crecientes de agua destilada antes de la digestión con proteasas y extracción de ADN (Dorris *et al.*, 2002). Para la extracción del ADN para ambas especies se utilizaron hembras separadas individualmente en tubos de microcentrífuga, como se explica en los pasos 1 y 2 a continuación.

Protocolo para la extracción de ADN en nematodos

PASO 1

PASO 2Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN fue realizada en un espectrofotómetro AmpliQuant AQ-07. Para la cuantificación de cada muestra fueron utilizados 10 µl del ADN, y se realizaron tres lecturas. Después de la cuantificación las muestras fueron diluidas a fin de ajustar una concentración del ADN para 5ng/µl.

Amplificación del ADN por PCR

Las secuencias de ADN ribosomal (ADNr), que codifican para la formación de ARN ribosómico, son encontrados universalmente en células vivas y se presentan repetidos en “tandem” centenas de veces. Cada unidad de repetición incluye 3 genes: ADNr 18S, ADNr 5.8S y ADNr 28S, los cuales son separados por dos regiones denominadas “espaciadores transcritos internos” (ITS) (Fig. 2). El gen 5.8S ARN

ribosomal (ARNr) es una región corta y altamente conservada. Por el contrario, ITS-1 e ITS-2 ARNr son regiones que han evolucionado a un ritmo mucho mayor que los genes 18S y 28S, por lo que estas regiones se usan para estudios filogenéticos en el nivel de especies, estudios genéticos a nivel de población y también con fines taxonómicos (Cherry et al., 1997). El LSU (28S) del ARNr es más variable que SSU ARNr y tiene menos posiciones ambiguas alineadas que los ITS y se ha utilizado para la resolución taxonómica y cuestiones filogenéticas a nivel de género y especie. La secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) y de la subunidad grande (LSU 28S) del DNA ribosomal (ADNr) nuclear son las secuencias más utilizadas en la caracterización molecular de nematodos a nivel de género y de especie (Stock *et al.* 2009) (Fig. 2). La reacción de amplificación de la región LSU (28S) del ADNr fue efectuada utilizando los primers específicos forward y reverse utilizados por Chaudhary *et al.*, 2011 (Tabla 1). Para el análisis de PCR las reacciones de amplificación fueron preparadas en un volumen final de 50 µl, conteniendo 5 µl de buffer (Invitrogen Life Technologies 200 mM Tris- HCl pH 8,4, 500mM KCl, 10x concentrado); 4 µl de dNTP (Invitrogen Life Technologies 2,5 mM); primers forward y reverse 3 µl (Invitrogen Life Technologies 10 pmol/µl), 2 µl de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies 50 mM); 2 µl de Taq DNA polimerasa (Invitrogen Life Technologies 5 U/µl); muestra de ADN 2 µl (5 ng/µl), agua libre de nucleasa 32 µl. La mezcla de la reacción fue sometida al termociclador “Mastercycler” (Eppendorf) previamente programado para 35 ciclos después de la desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C. Cada ciclo de amplificación fue constituido de tres etapas: desnaturalización (94 °C, 0:30 seg.), hibridación (56 °C, 0:45 seg.) y extensión (72 °C, 1min.). Al final de los 35 ciclos fue realizada una extensión por 10 minutos a 72 °C. Después de la amplificación las muestras fueron analizadas a través de electroforesis en un gel de agarosa 1,5%. Los geles fueron coloreados con bromuro de etidio y fotografiados con un fotodocumentador Digi Doc. Los productos obtenidos de la reacción de PCR fueron purificados utilizando el kit comercial de purificación “Wizard® SV Gel and PCR Clean – Up System”. La purificación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN, fue realizada después de la purificación en un espectrofotómetro AmpliQuant AQ-07; para la cuantificación de cada muestra fueron utilizados 10 µl del ADN, y se realizaron tres lecturas.

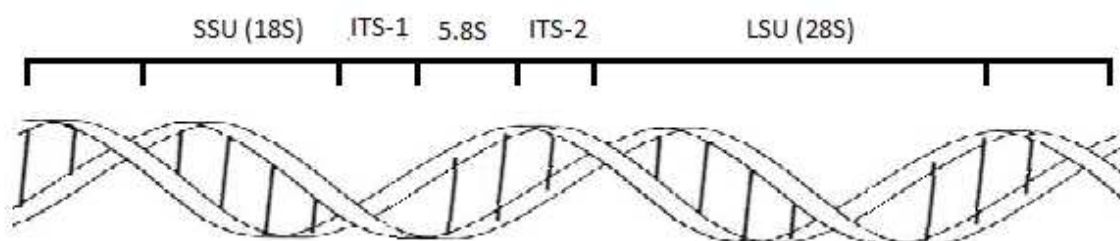


Figura 2. Representación esquemática de los genes ribosomales de nematodos.

Tabla 1. Secuencia de los primers utilizados en la amplificación de la región LSU rDNA para *Leidynema* sp. y *Hammerschmidtella* sp.

<i>Primers</i>	<i>Secuencia</i>
28S ADNr F	5'-TTG GCG TCT CAG TGT GAA AG-3'
28S ADNr R	5'-TTC ACC ATC TTT CGG GTC TC-3'

Fuente: Chaudhary *et al.*, 2011.

Secuenciación y análisis filogenético

Las secuencias de las muestras fueron realizadas en la Unidad de Genómica – Instituto de Biotecnología – CICVyA – INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) utilizando secuenciadores de capilares, con protocolos optimizados de terminadores fluorescentes. La secuenciación fue realizada por el método de Sanger *et al.* (1977); los ADN – molde (30 a 45 ng) fueron marcados por PCR utilizando los *primers* 28 S ADNr F y R (Tabla 1). Las secuencias fueron realizadas en un volumen final de 10 µl, conteniendo 4,0 µl de ADN de la muestra (PCR específica); 2,0 µl de cada *primers* y 4,0 µl del Kit “DYEnamic ET dye terminador Cycle Sequencing”. La

reacción fue sometida a un termociclador “Mastercycler” (Eppendorf), previamente programado para 35 ciclos después de la desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C. Cada ciclo de amplificación fue constituido de tres etapas: desnaturalización (94 °C, 30 seg.), hibridación (56 °C, 45 seg.) y extensión (72 °C, 1 min.). Al final de los 35 ciclos fue realizada una extensión por 10 minutos a 72 °C.

Los alineamientos y análisis de las secuencias nucleotídicas fueron realizados con el programa Sequencher v 4.5 (Gene Codes Corp.), en la matriz se incluyeron secuencias de referencia para las especies de *Leidynema appendiculata* y *Hammerschmidtella diesingi*. Para la construcción del árbol filogenético, se utilizó el principio de máxima parsimonia implementado en el programa TNT versión 1.1 (Goloboff *et. al.*, 2008). Los valores de bootstrap fueron obtenidos basados en 1000 réplicas. Para el análisis filogenético, se seleccionaron las secuencia que corresponden a la subunidad grande (LSU o 28S) del DNA ribosomal (Fig. 2) y dichas secuencias fueron sometidas a una búsqueda en NCBI, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el GenBank para la asignación de los número de entrada. Las siguientes secuencias de la familia Thelastomatidae fueron seleccionadas (Tabla 2): *Leidynema appendiculata* GQ925910.1, *L. appendiculata* EU365630.1, *L. appendiculata* JQ343844.1, *L. appendiculata* KC540759.1, *L. portentosa* GQ401114.1, *Hammerschmidtella cristata* EU365629.1, *H. diesingi* EU365628.1, *H. diesingi* JQ343843.1, *Thelastoma* sp. JQ343845.1.

Tabla 2. Origen de las secuencias utilizadas para el análisis filogenético.

Especie	Nº GenBank	Hospedador	País	Secuencia de Adn amplificada
<i>Leidynema appendiculata</i>	GQ925910.1	<i>P. americana</i>	India	Secuencia parcial del gen de la subunidad grande 28S del ARN ribosomal
<i>L. appendiculata</i>	EU365630.1	<i>B. orientalis</i>	Rusia	Secuencia parcial del gen de la subunidad grande 28S del ARN ribosomal (D2-D3)
<i>L. appendiculata</i>	JQ343844.1	<i>Blaptica</i> sp.	Argentina	Secuencia parcial del gen de la subunidad grande 28S del ARN ribosomal (D2-D3)

<i>L. appendiculata</i>	KC540759.1	<i>P. fuliginosa</i>	Japón	Secuencia parcial del gen de la subunidad grande 28S del ARN ribosomal (D2-D3)
<i>L. portentosae</i>	GQ401114.1	<i>Gramphadorhin a portentosa</i>		Secuencia parcial del gen de la subunidad grande 28S del ARN ribosomal
<i>Hammerschmidtella cristata</i>	EU365629.1	<i>Gramphadorhin a portentosa</i>	Rusia	Secuencia parcial del gen de la subunidad grande 28S del ARN ribosomal (D2-D3)
<i>H. diesingi</i>	EU365628.1	<i>B. orientalis</i>	Rusia	Secuencia parcial del gen de la subunidad grande 28S del ARN ribosomal (D2-D3)
<i>H. diesingi</i>	JQ343843.1	<i>P. americana</i>	Argentina	Secuencia parcial del gen de la subunidad grande 28S del ARN ribosomal (D2-D3)
<i>Thelastoma sp.</i>	JQ343845.1	<i>P. americana</i>	Argentina	Secuencia parcial del gen de la subunidad grande 28S del ARN ribosomal (D2-D3)

RESULTADOS

Caracterización morfológica y morfométricas de los nematodos hallados en *Periplaneta fuliginosa*.

Los nematodos se encontraron en la parte anterior del intestino posterior (colon) del hospedador, la cabeza de la hembra dirigida hacia adelante con el macho junto o anterior a ella. El adulto macho de cada especie de nematodo es muy pequeño en comparación con la hembra adulta. Las hembras y las larvas de los nematodos aparecieron en mayor número que los machos en los ejemplares infectados.

Características del Género *Leidynema* Schwenk (Travassos, 1929)

Hembra: la extremidad cefálica está formada por dos anillos, el primer anillo pequeño lleva un par de anfidios pequeños con un poro anfidial circular y piriforme. El segundo anillo es más grande que el primero, y luego le sigue una serie de anillos medianos que recorren todo el cuerpo. Alas laterales presente. Los huevos son grandes, alargados y de forma triangular en sección transversal. La cola de la hembra es larga, filiforme o atenuada. Esófago con un corpus dividido en una parte estrecha anterior y una porción posterior amplia de aproximadamente la misma longitud, un istmo corto, y el extremo del bulbo presenta una forma esférica. La característica más notoria de este género fue definida por primera vez por Schwenck (en Travassos, 1929) para caracterizar dicho género y es la presencia de un ciego gástrico o divertículo en el intestino (Fig. 3). La vulva cerca de la mitad del cuerpo. Vagina y útero comúnmente presentes. Anfidélficas (úteros de posición opuestos).

Macho: la extremidad cefálica está formada por un anillo único amplio. Alas laterales presente o ausente. Espícula presente o ausente. La extremidad caudal en los machos esta abruptamente truncada con una espina terminal corta o sin ella. Papilas caudales presentes distribuidas de 3 a 5 pares.

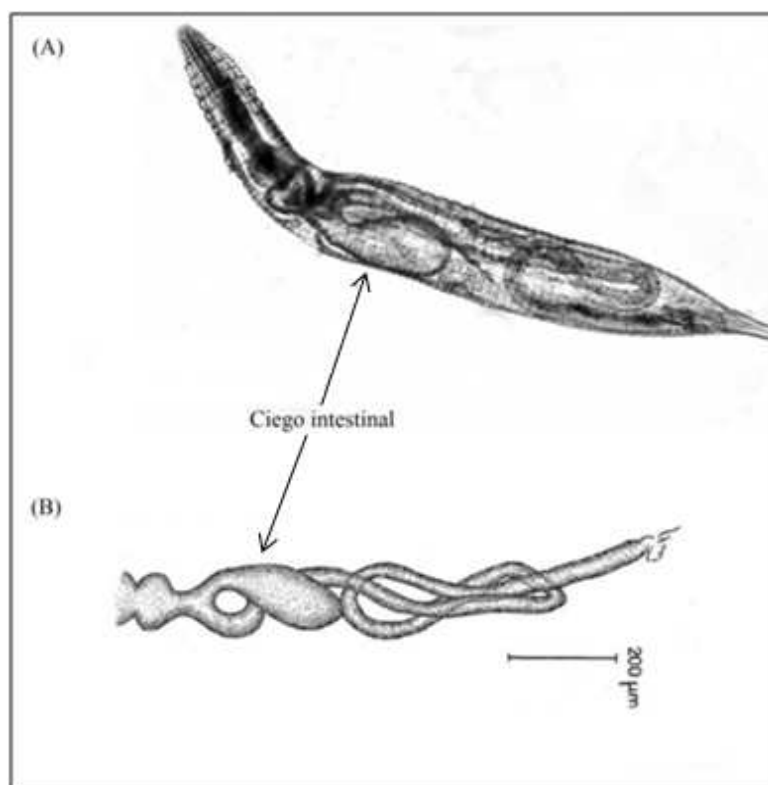


Figura 3. (A) Intestino de *Leydinema* mostrando el divertículo distintivos del género. Se observan estas características en una hembra joven. (B) Intestino de *Leydinema portentosa* realizado por Van Waerebeke en 1978.

Leidyneia appendiculata (Leidy, 1850) Chitwood, 1932.

A continuación se describen las características morfológicas y morfométricas observadas en los ejemplares hallados (medidas en μm):

Hembras adultas ($n= 30$) $L= 3052 \pm 585,8$ (2325,2-3913,3), $W= 275,3 \pm 48$ (192,4-337,2) $a= 11,37 \pm 1,23$ (8,3- 13,1), $b= 7 \pm 0,9$ (5,5- 8,5), $c= 5,2 \pm 0,95$ (3,6-6,5), $V= 43,8 \pm 4,2$ (39,3-50,1), largo de la cavidad bucal o estoma $13,7 \pm 1,8$ (10,5-16,8), ancho de la cavidad bucal o estoma $9,6 \pm 2$ (7,2-12,3), distancia desde cabeza a base del esófago $430 \pm 48,2$ (349,6-490), ancho a nivel de la base del esófago $178,5 \pm 34,4$ (80,9-223), largo del corpus $300,7 \pm 34,1$ (229-338,4), ancho del corpus $51,8 \pm 5,6$ (41,9-57,6), largo del istmo $27,9 \pm 6$ (15,8-37,1), ancho del istmo $37,8 \pm 4,1$ (28,4-43,5), largo del bulbo basal $100,1 \pm 10,2$ (83,9-116), ancho del bulbo basal $106,6 \pm 8,5$ (93,4-119,3), distancia desde la cabeza al anillo nervioso $163,4 \pm 16,5$ (135,3-191,6), distancia

desde la cabeza al poro excretor $690 \pm 208,9$ (376,9-1022), ancho a nivel del poro excretor $204,4 \pm 45,8$ (273,8-146,4), distancia desde la cabeza a la vulva $1386,5 \pm 329,6$ (940,3-1961), ancho a nivel de la vulva $253,4 \pm 40$ (305-200,6), longitud del apéndice caudal $594,4 \pm 46,9$ (520,6-667,2), ancho a nivel del ano $121 \pm 21,6$ (80,3-156), largo del huevo $=106 \pm 9,9$ (119,4-92,6), ancho del huevo $= 42,7 \pm 6,8$ (54,9-34,2).

Machos adultos (n=30) L= $793.2 \pm 295,6$ (338,2-1209,1), W= $61,5 \pm 21,2$ (34,4-91,8), a= $12,9 \pm 2,3$ (9,8-17,6), b= $4,5 \pm 1,1$ (2,9-5,9), c = $191,7 \pm 103,4$ (82,9-307), largo de la cavidad bucal o estoma $9,7 \pm 1,8$ (6,1-11,3), ancho de la cavidad bucal o estoma $4 \pm 1,7$ (3-7,8), distancia desde la cabeza a la base del esófago $181,8 \pm 29,5$ (121,6-214,7), largo del esófago $173,1 \pm 18,6$ (151,8-194,1), ancho a nivel de la base del esófago $54,3 \pm 11,4$ (38,3-64,8), largo del corpus $129,8 \pm 26,2$ (83,9-150,8), largo del istmo $15,6 \pm 5,1$ (9,8-19,6), largo del bulbo basal $37,4 \pm 4$ (31-43,9), ancho del bulbo basal $35,4 \pm 6,8$ (22,3-42,7), distancia desde la cabeza al anillo nervioso $121,7 \pm 30,3$ (75-151,1), distancia desde la cabeza al poro excretor $223,7 \pm 84,4$ (116-405,2), longitud del apéndice caudal= $4,9 \pm 1,3$ (3,5-6,3), espícula $30,1 \pm 2,8$ (25,3-33).

Nematodos con dimorfismo sexual muy marcado, de dimensiones variables. Cutícula con estriaciones transversales. Las hembras tienen un cuerpo cilíndrico, disminuyendo en ambos extremos (Fig. 4a). Hembras con alas laterales bien definidas que terminan en una proyección espinosa (Fig. 4e, 5). La región cefálica está formada por un anillo anterior, boca central rodeada por ocho papilas submedianas bien visibles. Un par de anfidios grandes circulares (Fig. 6). Entre el primer anillo cefálico y el primer anillo somático se encuentra un segundo anillo cefálico, que es estrecho y de apariencia arrugada (Fig. 6). Se continúan los anillos somáticos hacia el extremo posterior con un aumento gradual en la longitud y el ancho de los anillos (Fig. 4). Estoma levemente más largo que ancho, las hembras adultas presentan una fuerte esclerotización formada principalmente por el mesostoma y el metastoma fusionados y el telostoma; el Queilostoma no presenta esclerotización (Fig. 4c). El esófago es típico de thelastomatidos, con una clara división en un corpus musculoso, un estrecho istmo, y un bulbo basal posterior con tres valvas que presentan estriaciones cuticulares. A diferencia de la mayoría de los thelastomatidos, el corpus se divide en una región anterior estrecha o procorpus y una región posterior cilíndrica o metacorpor (Fig. 4b). La morfología del esófago de la hembra adulta no es la misma para las diferentes etapas de desarrollo de la especie y el metacorpor está ausente en machos adultos (Fig. 7). El intestino

ensanchado anteriormente formando un cardias, que se continúa con el divertículo intestinal o ciego característico de las hembras adultas, y que permite que este género sea fácilmente identificable dentro de los thelastomatidos (Fig. 4 a y b). El ano en el extremo posterior (Fig. 5). Anillo nervioso de posición anterior rodeando el corpus (Fig. 4 D). Poro excretor visible, localizado en el tercio anterior del cuerpo (Fig. 4a). Hembras didélficas (presencia de dos úteros), anfidélficas (los úteros tienen direcciones opuestas). Vulva en la mitad del cuerpo o ligeramente por detrás y dispuesta en sentido transversal (Fig. 4a). Vagina corta y musciosa. Cola larga y filiforme, con un par de fasmidios de ubicación posterolateral al ano (Fig. 5). Huevos elípticos ligeramente comprimidos (Fig. 4 e).

Machos con cuerpo pequeño en comparación con las hembras y curvado en el extremo posterior (Fig. 7a). Cutícula anillada a lo largo de la longitud del cuerpo, en la región anterior los anillos son más profundos y pequeños (Fig. 7b). Alas laterales presentes que se extienden desde la región media del corpus hasta la proximidad del ano (Figs. 7d, e y 8a). Tienen un corpus de diámetro uniforme, que se continúa con un corto itsmo y un bulbo basal valvado, con tres placas estriadas (Fig. 7 b y c). Testículo único, espícula presente (Fig. 7 d). La extremidad caudal del macho esta abruptamente truncada con una espina terminal corta en su región terminal (Fig. 7 d y 8). Tres pares de papilas genitales o caudales: un par de grandes papilas preanales subventrales, un par posanal subventral y un par postanal subdorsal (Fig. 7dy8).

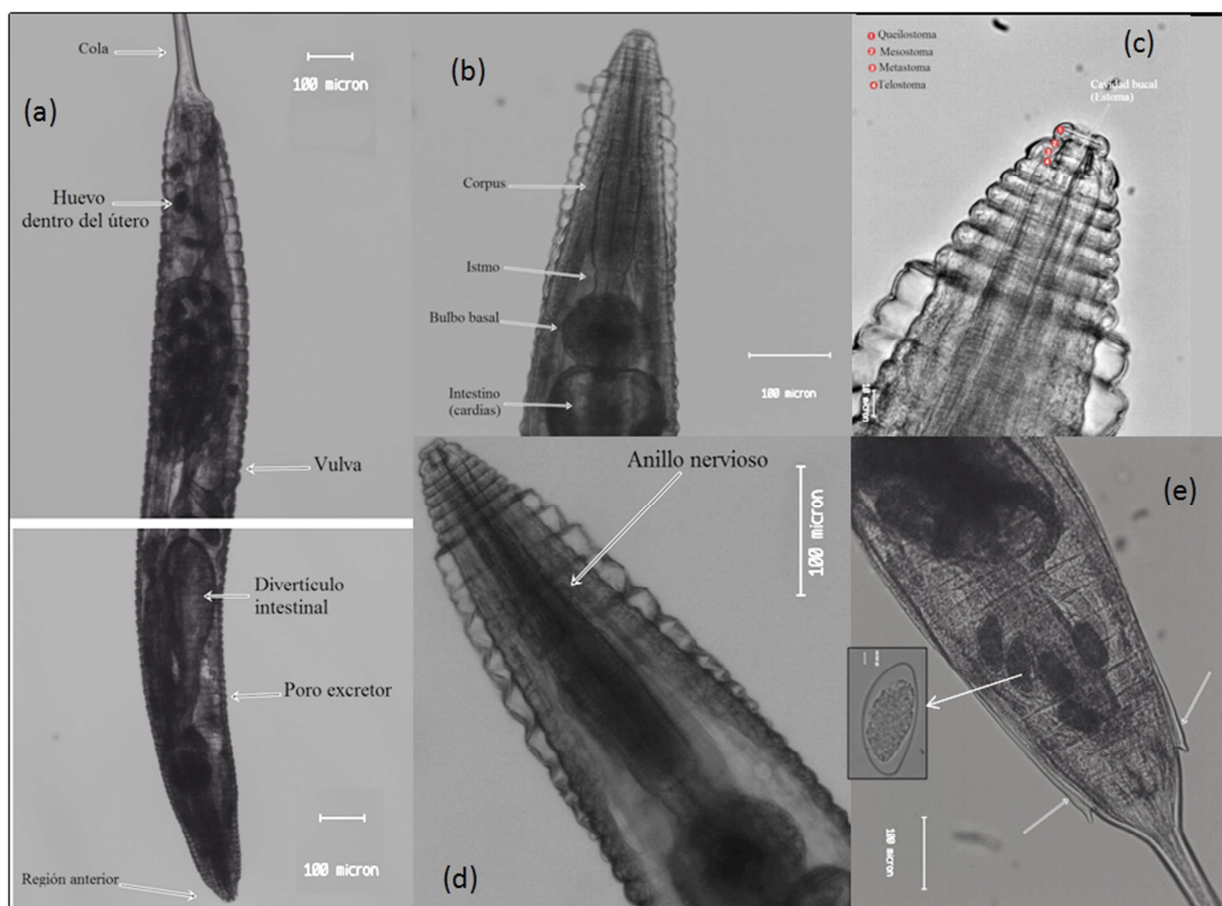


Figura 4. Detalles de la morfología de la hembra de *Leidyneia appendiculata* (a) vista lateral del cuerpo. (b) región anterior. (c) región cefálica. (d) Región anterior, la flecha marca la ubicación del anillo nervioso. (e) la región posterior de la hembra, las flechas marcan las alas que terminan en espinas, en el recuadro detalle del huevo.

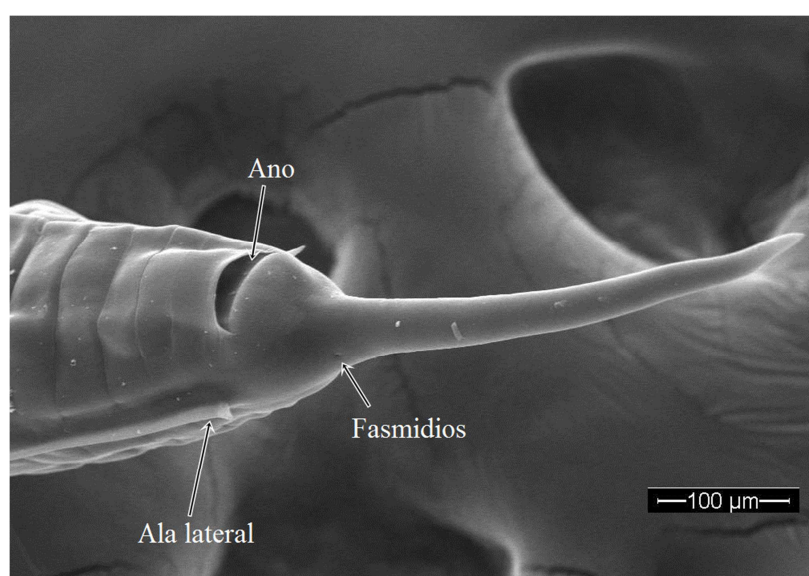


Figura 5. Detalle de la región posterior de la hembra de *L. appendiculata* vista al MEB.

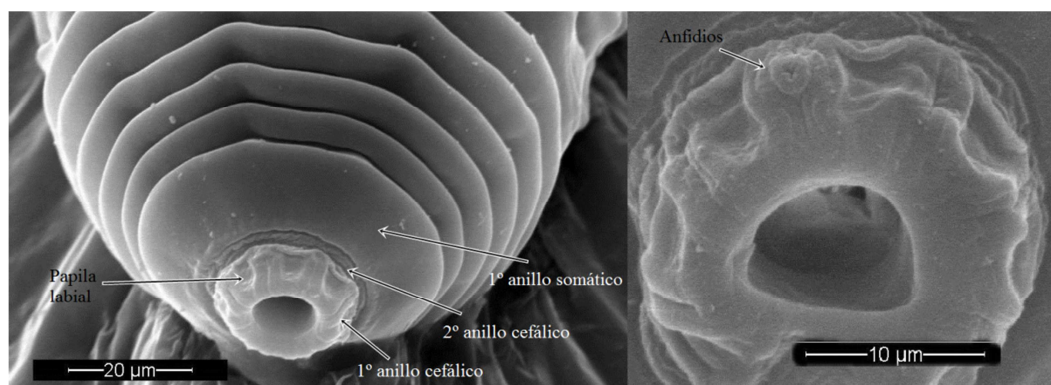


Figura 6. Región anterior de la hembra adulta de *L. appendiculata* vista al MEB.

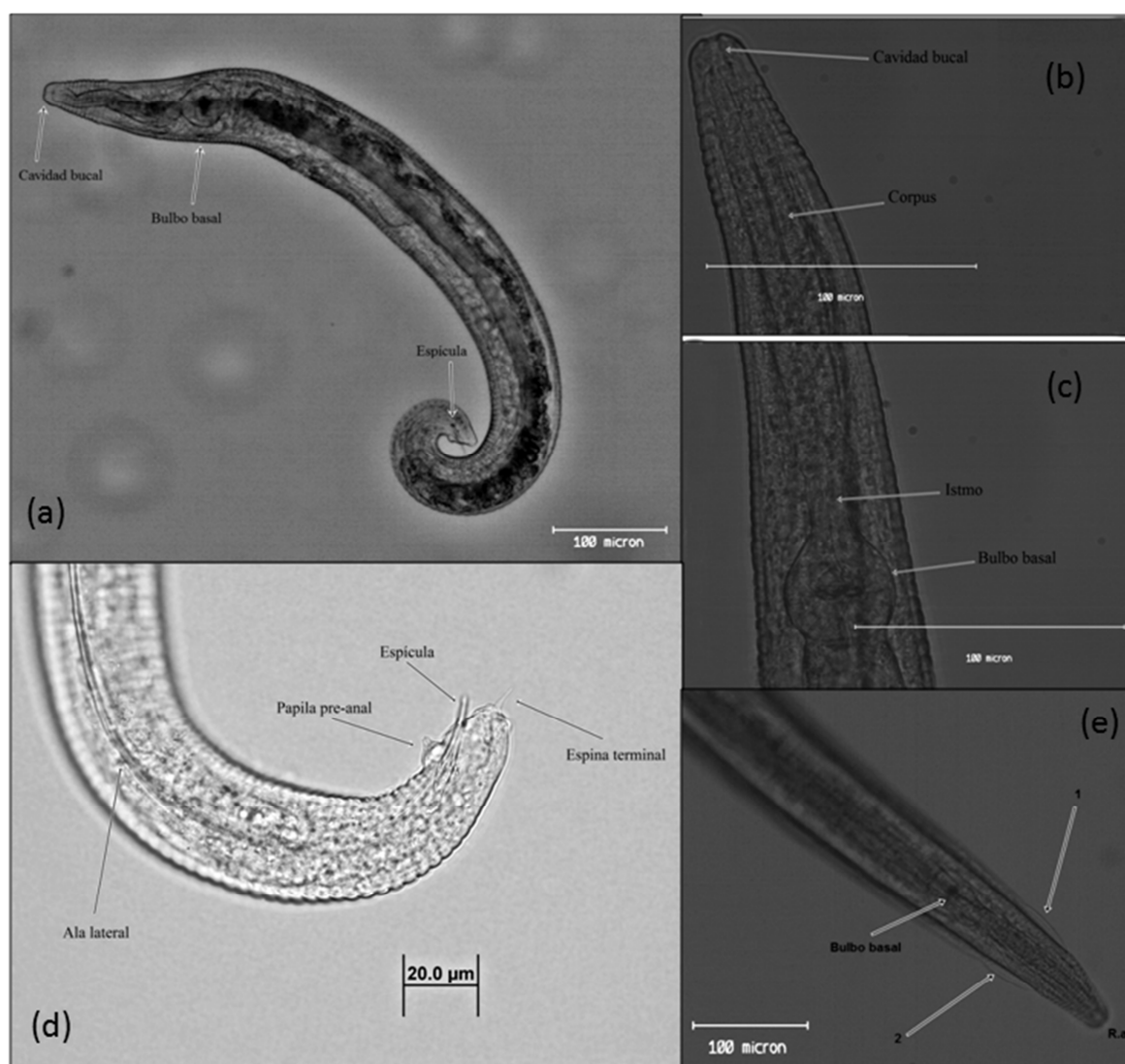


Figura 7. (a) Detalles de la morfología del macho de *Leidyneia appendiculata* (b) vista región anterior. (c) detalle del bulbo basal. (d) Región posterior. (e) Región del corpus donde nacen las alas laterales (1 y 2).

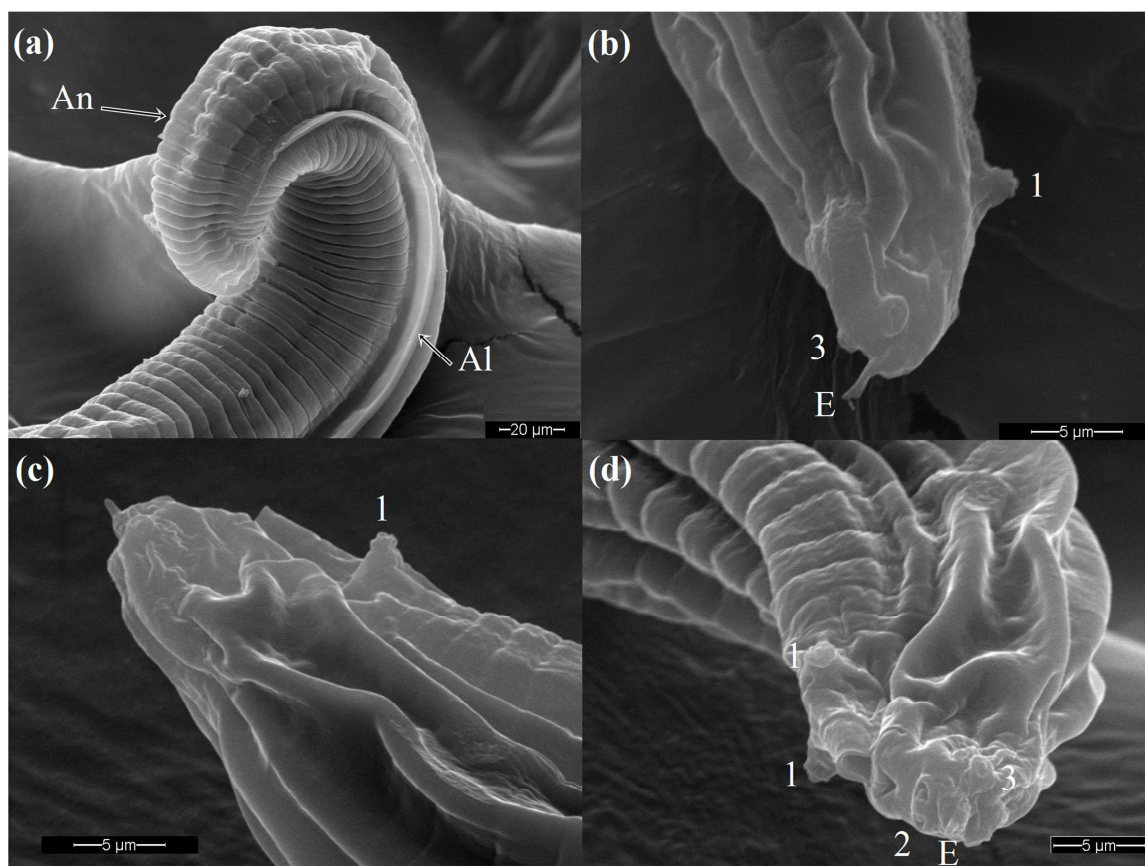


Figura 8. Región posterior del macho de *L. appendiculata* vista alMEB. Donde se observan las papilas caudales (a) detalle del ala lateral, cuerpo anillado y espina caudal. (b) La región dorsal del cuerpo se ubica a la izquierda de la imagen donde se observa el par de papilas post-anal subdorsal y una de las papilas preanal subventral. (c) hacia arriba de la imagen observamos la región ventral del cuerpo del nematodo, con una de las papilas pre-anal subventral y espina terminal. (d) se observan los tres pares de papilas. 1- Un par de papilas preanal subventral, 2- Un par de papilas post-anal subventral, 3- un par de papilas post-anal subdorsal, E- espina terminal, An- anillos somáticos, Al- alas laterales.

El macho de *L. appendiculata* presenta 3 pares de papilas caudales, forma y disposición en detalle al MEB (Fig. 8). El par de papilas preanal subventral son de mayor tamaño, protuberantes y tienen forma de roseta (Fig. 8, b y c). El par de papilas post-anal subdorsal tienen una forma redondeada, y no están tan desarrolladas como la papila preanal subventral (Fig. 8 d). Por último el par de papilas post-anal subventral

son las más pequeñas de los tres pares, y presentan una forma semitriangular. Es la primera vez que se detallan las papilas del macho vistas al MEB.

Hospedador: ninfas y adultos de la cucaracha *P. fuliginosa* (Blattodea, Blattidae).

Localidad: La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina.

El Material fue depositado en la colección helmintológica del Museo de La Plata cuyo número de acceso es MLP-He 6904, Paseo del Bosque s/n, 1900

Características del Género *Hammerschmidtella* Chitwood, 1932

Hembra: cuerpo en forma de huso. Estoma corto y ancho. La extremidad cefálica está formada por dos anillos. El esófago con un corpus que está dividido en una región anterior cilíndrica llamada procorpus, con un prominente bulbo medio o pseudobulbo piriforme. Un istmo cilíndrico. Y un gran bulbo llamado postcorpus o bulbo basal valvado. La vulva ubicada en el tercio anterior del cuerpo. Didélficas (presencia de dos úteros), prodélficas (úteros paralelos dirigidos anteriormente). La cola es filiforme y disminuyendo hacia el extremo. Los huevos son pequeños, alargados y triangulares en sección transversal y aplastados en uno de sus lados.

Macho: la extremidad cefálica está formada por un anillo único ensanchado. Anfidios situados en pequeños pedúnculos. Esófago con un corpus claviforme. Extremidad caudal bruscamente truncada posterior al ano con un apéndice espinoso. Papilas caudales ausentes o presentes que consisten en un par subcentral preanal, un par lateral adanal, un par subventral por detrás del ano y una papila dúplex en la base del apéndice caudal. Espícula presente o ausente.

Hammerschmidtella sp.

A continuación se describen las características morfológicas y morfométricas observadas en los ejemplares descritos (medidas en μm):

Hembras adultas (n=30): L= $2341,5 \pm 251,9$ (1568,4-2505), W= 196 ± 24 (163,9-245), a= $11,9 \pm 1,5$ (9,6-14,4), b= $6,8 \pm 0,7$ (5,2-7,5), c= $3,4 \pm 0,4$ (2,9-4,3), V= $20,3 \pm 2,1$ (17,8-25,8), largo de la cavidad bucal $5,2 \pm 0,8$ (4,3-6,8), ancho de la cavidad bucal $11,4 \pm 1,4$ (9,7-13,1), distancia desde cabeza a base del esófago 343 ± 26 (304,2-378,6), ancho a nivel de la base del esófago $144,7 \pm 7,9$ (130,9-153,6), largo del corpus $119,3 \pm 14$ (99,9-140), ancho del corpus $30,3 \pm 4,3$ (24,8-38,3), largo del pseudobulbo $100,8 \pm 11$ (81,5-114), ancho del pseudobulbo $69,8 \pm 5,5$ (57,9-75,8), largo del istmo $37,5 \pm 3,9$ (30,9-45,1), ancho del istmo $26,6 \pm 4,6$ (18,7-37,6), largo del bulbo basal $90 \pm 8,1$ (70,1-99,8), ancho del bulbo basal $98,2 \pm 5,5$ (83,5-103,4), distancia desde cabeza al anillo nervioso $118,2 \pm 15,4$ (98,2-139,8), ancho a nivel del anillo nervioso $85,1 \pm 8,9$ (68,8-97), distancia desde cabeza al poro excretor $337,5 \pm 32,8$ (292-410,6), ancho a nivel del poro excretor $140,6 \pm 7$ (127,4-147,4), distancia desde la cabeza a la vulva $471,8 \pm 38,9$ (404,3-555), ancho a nivel de la vulva $182,6 \pm 14,1$ (151,9-198,4), longitud del apéndice caudal= $719,8 \pm 91,1$ (548,1-865,6), ancho a nivel del ano $86,1 \pm 26,5$ (50,8-147,5), largo de la vagina $43,2 \pm 9,1$ (31,8-57,7), ancho de la vagina $36,9 \pm 10,6$ (28,6-52,3), largo del huevo = $81,9 \pm 4,2$ (74,8-87,2), ancho del huevo = $32 \pm 1,1$ (30,3-32,9).

Machos (n= 20) L= $613,7 \pm 88$ (450-731), W= $60,1 \pm 10,8$ (47,6-75,3), a= $10,3 \pm 1,3$ (8,6-12,5), b= $4,9 \pm 0,6$ (3,9-5,6), c = $5,9 \pm 0,9$ (4,2-7,1), largo de la cavidad bucal o estoma $2,1 \pm 0,2$ (1,8-2,2), ancho de la cavidad bucal o estoma $3,1 \pm 0,2$ (2,9-3,4), distancia desde la cabeza a la base del esófago $128,6 \pm 4,7$ (120,5-134,1), largo del esófago $122,9 \pm 6,6$ (117,4-132,1), ancho a nivel de la base del esófago $25,6 \pm 2,7$ (21-28,8), largo del bulbo basal $23,5 \pm 3,8$ (18,8-27,3), ancho del bulbo basal $18,8 \pm 2,3$ (16,7-21,8), longitud del apéndice caudal= $108,6 \pm 9$ (95-117,04), espícula $23,1 \pm 2,4$ (19,4-27).

Las hembras presentan cuerpo en forma de huso (Fig. 9 a). La abertura del estoma es triangular (Fig. 10 a y b). En la extremidad cefálica la boca está rodeada por ocho labios similares que están dispuestos simétricamente en el primer anillo cefálico. Presenta 8 interlabios con 8 papilas labiales. Los anfidios son piriformes y se ubican en dos grandes interlabios laterales (Fig. 10 a y b). A lo largo de todo el cuerpo presentan

una cutícula estriada con anillos. Cutícula anillada a lo largo de la longitud del cuerpo, los anillos son más profundos hasta la base del pseudobulbo (Fig. 9 a y e). Presencia de alas laterales que comienzan en la base del esófago y llegan hasta el ano, no terminan en espinas. El estoma se encuentra reducido. Se observa la presencia de tres dientes formados por los anillos cuticulares del protostoma (Figs. 9c y 10 a, b). El esófago sigue el típico patrón de thelastomatidos, se divide en un corpus, istmo, y bulbo posterior valvado (Fig. 9 a). Sin embargo, el corpus muestra una división en un estrecho, procorpus cilíndrico, y un metacorus o pseudobulbo piriforme, y fuertemente muscularizado, bien diferenciado del istmo (Fig. 9 b). El metacorus fue observado solo en las hembras adultas. El anillo nervioso situado en la región cilíndrica del corpus, cerca del inicio del metacorus. El poro excretor se encuentra en la base del esófago (Fig. 9 b). El intestino se expande en la región anterior para formar el cardias (Fig. 9 e). La vulva ligeramente protuberante ubicada en el tercio anterior del cuerpo (Fig. 9e). Huevos alargados y elipsoidales con opérculo (Fig. 9 d). La cola es filiforme y disminuyendo hacia el extremo, con dos fasmidios ubicados posterolateralmente.

Macho, cuerpo pequeño en forma de huso (Fig. 11 a). El extremo posterior se afina formando un cono genital en cuyo extremo se ubica el ano (Figs. 11d, e y 12). Presenta un apéndice caudal espiniforme de posición dorsal al ano (Fig. 11a). Cutícula finamente anillada. Presencia de alas laterales que se extienden desde la porción media del corpus hasta la proximidad del ano, donde inician las papilas genitales (Figs. 11 c, d y 12). La cavidad bucal es pequeña, más ancha que larga. El esófago con un corpus cilíndrico levemente ensanchado. Un istmo corto seguido por un bulbo basal ovalado (Fig. 11 b). El anillo nervioso se encuentra situado a nivel del istmo. El poro excretor se encuentra ubicado detrás de la unión del esófago con el intestino. Testículo único. Espícula presente. En la región posterior del macho se observan 4 pares de papilas caudales. La extremidad posterior del macho se continua y se afina formando un “cono genital” en cuyo extremo se encuentra la cloaca (Fig. 11 d, e). El macho presenta cuatro pares de papilas: (1) un par de grandes papilas sub-ventral pre-anales. (2) Un par de grandes papilas pre-anales latero-ventrales. Un par de pequeñas papilas adanales ubicadas en el extremo del cono genital, es decir estas papilas se ubican paralelas a la cloaca. (4) Una papila ventral dúplex en la base del apéndice caudal. (Figs. 11 d,e y 12)

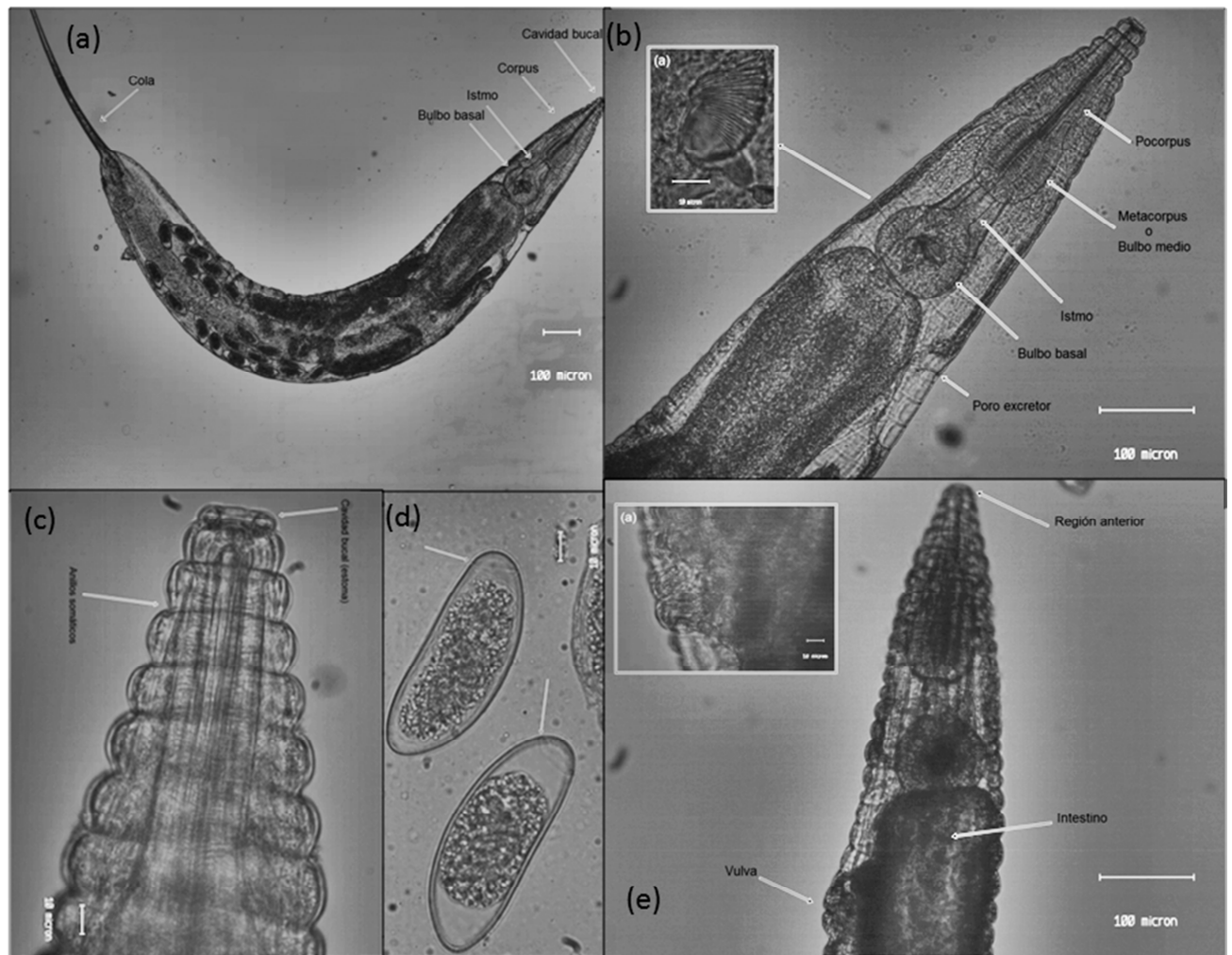


Figura 9. (a) Hembra de *Hemmerschmidtella* sp. vista al microscopio óptico. (b) detalle del esófago y en (a-blanca) detalle de una valva estriada del bulbo basal. (c) región anterior. (d) huevos, las flechas marcan el opérculo. (e) posición de la vulva y en (a-blanca) detalle de la vulva.

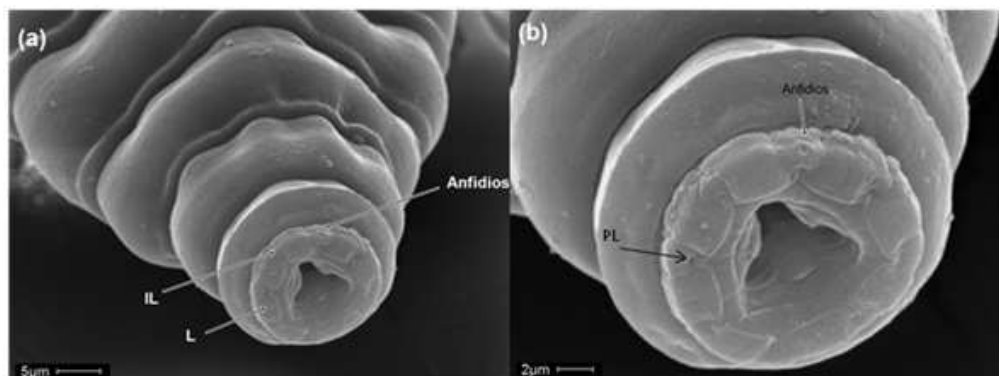


Figura 10. (a) Región anterior de la hembra de *Hemmerschmidtella* sp. vista al MEB y (b) observan en mayor aumento el estoma la boca con dientes y los anfidios.

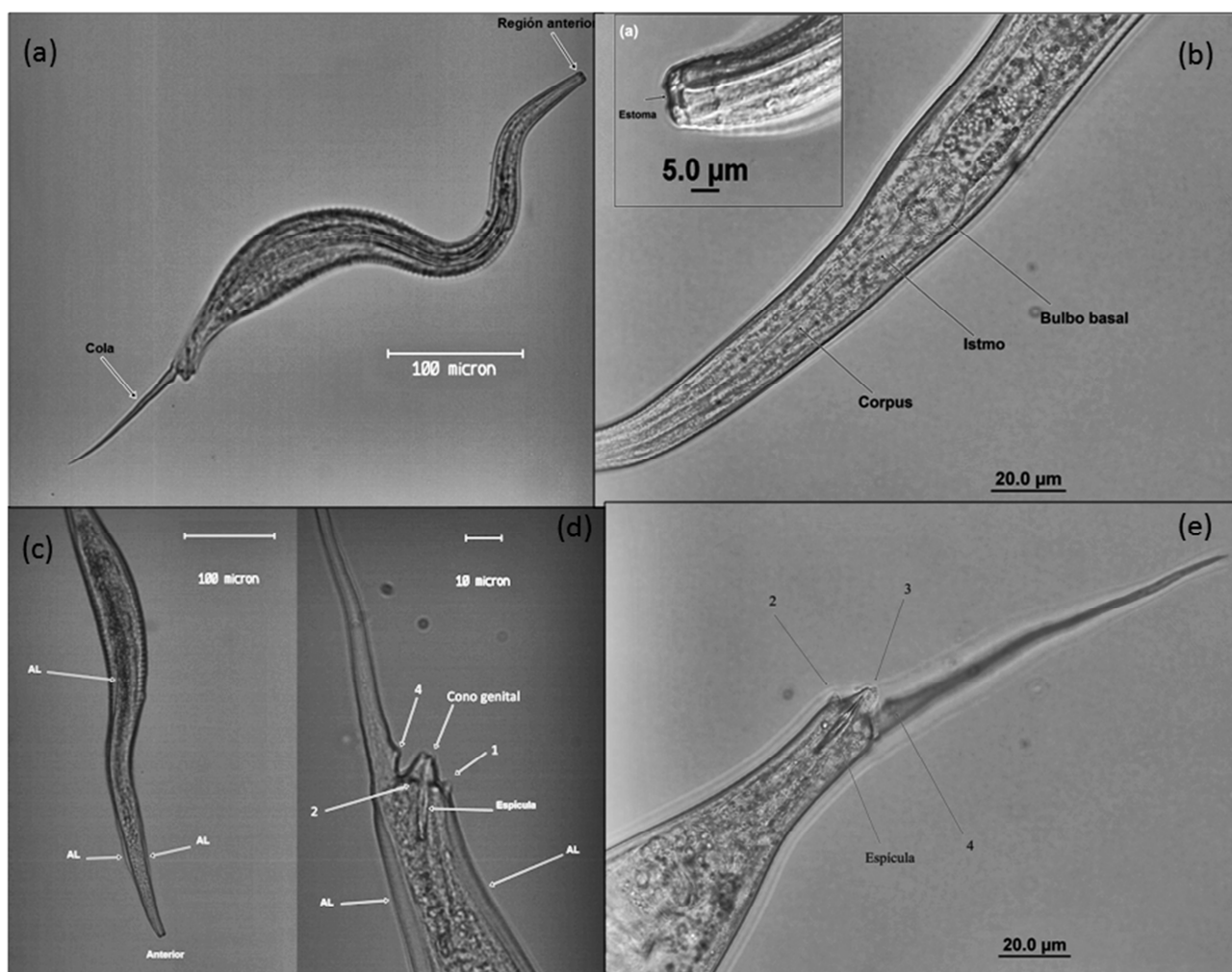


Figura 11. (a) Macho de *Hammerschmidtella* sp. visto al microscopio óptico. (b) detalle del esófago y en el recuadro detalle del estoma (c) alas laterales (d) y (e) región posterior.

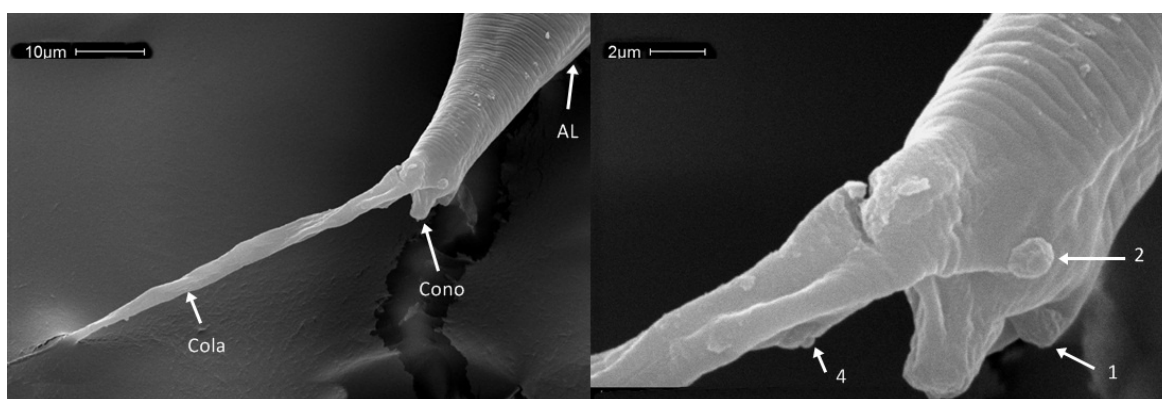


Figura 12. Región posterior del macho de *Hammerschmidtella* sp. vista al MEB

Hospedador: ninfas y adultos de la cucaracha *Periplaneta fuliginosa* (Blattodea, Blattidae).

Localidad: La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina.

El Material fue depositado en la colección helmintológica del Museo de La Plata cuyo número de acceso es MLP-He 6905, Paseo del Bosque s/n, 1900

Parámetros cuantitativos de las poblaciones de parásitos presentes en *P. fuliginosa*:

El 81 % de los individuos de *P. fuliginosa* (N=100) estaban parasitados por nematodos Thelastomatidos. El 19% no presentó nematodos en su intestino. La prevalencia de *L. appendiculatum* fue del 80 %, mostrando una abundancia media de 2,6 y una intensidad media de 3,2. Ambos géneros fueron observados simultáneamente en el 74 % de las cucarachas analizadas. La prevalencia del genero *Hammerschmidtella* sp.fue del 75 % , con una abundancia media de 3,5 y una intensidad media de 4,7.

Identificación molecular de los nematodos parásitos.

Ambas especies de nematodos fueron identificadas por sus caracteres morfológicos y medidas morfométricas como *Hammerschmidtella* sp. y *L. appendiculatum*, se decidió confirmar la identificación mediante técnicas moleculares.

La secuencia de la región que codifican para el gen ARN de la subunidad grande del ribosoma (LSU-28S) fue parcialmente secuenciado y amplificado tanto para *L. appendiculatum* como para *Hammerschmidtella* sp, el fragmento obtenido fue de 220 pb utilizado por Chaudhary *et al.* (2011) para identificar a *L. appendiculatum*.

El protocolo utilizado para la extracción de ADN resultó efectivo, en la tabla 4 se muestran los resultados de la cuantificación de las muestras de ADN realizadas en un espectrofotómetro.

Tabla 4. Cuantificación de las muestras de ADN realizadas con un espectrofotómetro.

Especie	dssADN ug/ml	Pureza (1,8-2)	PCR n°
Hembra de <i>H. diesingi</i> ♀	4,970	1,54	1
Hembra de <i>L. appendiculatum</i>	9,26	0,96	2

dss, doble cadena

Visualización del resultado de PCR:

Se preparó un gel de agarosa al 1% en Buffer de electroforesis TBE (Anexo) y Bromuro de Etidio (0,1 µl/ml). Se tomaron 5 µl del producto amplificado, a los que se añadieron 1 µl de buffer de siembra. En el primer pocillo del gel se colocaron 3 µl de un marcador de tamaños 100-1500 pares de bases (pb) DNA Ladder (Promega).

La amplificación con los primers que codifican para la región 28S ADNr originó un único fragmento de 220pb en todas las pruebas realizadas para ambas especies (Fig. 13).

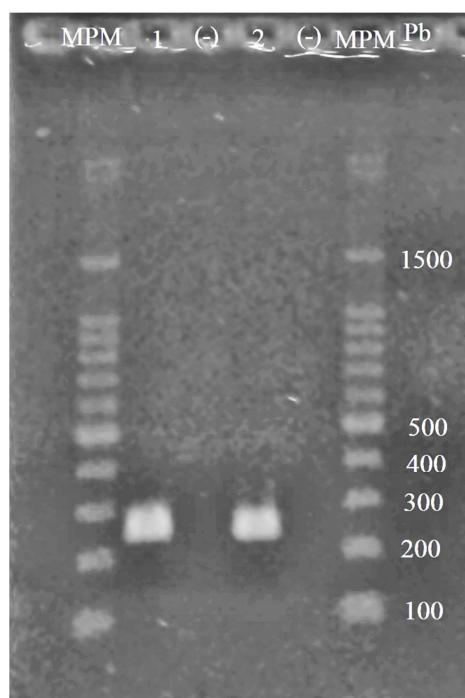


Figura 13. Perfil electroforético del producto de amplificación de la región de la subunidad grande (LSU 28S) del DNA ribosomal (ADNr) nuclear. MPM: marcador de peso molecular. (1) muestra *Hammerschmidtella*, (2) muestra *L. appendiculata*, (-) control negativo de PCR, pb: pares de bases.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas en este trabajo con aquellas secuencias de nematodos que están depositadas en el GenBank (NCBI) (Tabla 3) permitió la obtención de un árbol filogenético (Fig. 14). En este árbol se observa la agrupación del género *Hammerschmidtella* y la especie de *L. appendiculata* en dos grupos monofiléticos bien justificados por los datos según indican las proporciones de los bootstrap (expresadas en porcentaje) (Fig. 14), con 64 y 98 % respectivamente. Con bootstraps mayores de 50 puede considerarse una rama bien soportada. Las especies de *L. appendiculata* presentan una politomía entre KC540759.1, JQ343844.1 y EU365630.1. La especie de *L. appendiculata* recolectada en India (GQ925910.1) en el intestino de *P. americana* y la especie que encontramos en el intestino de *P. fuliginosa* en Argentina forman un nodo bien sustentado. El nodo del género *Hammerschmidtella* se encuentra bien sustentado (64%), el nodo de la especie *H. diesingi* también es un nodo bien sustentado (62%). Si bien estos resultados podrían apoyar nuestra hipótesis de que la especie encontrada en el intestino de *P. fuliginosa* es una nueva especie dentro

del género, será necesario secuenciar el segmento completo del gen 28S ADNr y comparar con las especies que se encuentran en el Genbank.

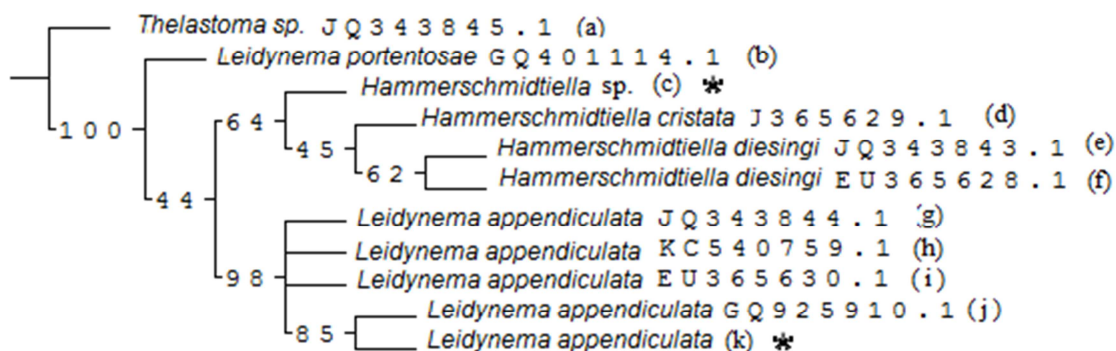


Figura 14. Árbol filogenético donde se observan las relaciones de las diferentes especies de nematodos obtenidos de diferentes especies de cucarachas de diferentes regiones geográficas. Las letras representan el hospedador y el país de recolección (a) *Periplaneta americana*, Argentina; (b) *Gromphadorhina portentosa*; (c) *P. fuliginosa*, Argentina; (d) *G. portentosa*, Rusia; (e) *P. americana*, Argentina; (f) *Blatta orientalis*, Rusia; (g) *Blaptica* sp., Argentina; (h) *P. fuliginosa*, Japón; (i) *B. orientalis*, Rusia; (j) *P. americana*, India; (k) *P. fuliginosa*, Argentina. (*) corresponde a las muestras recolectadas en este trabajo.

DISCUSIÓN

En el intestino de *P. fuliginosa* se encontró una coexistencia de *L. appendiculata* y *Hammerschmidtella*. Esto puede ser parcialmente explicado sobre la base de las preferencias alimentarias (Hominick *et al.*, 1973). La morfología del tracto digestivo anterior de *L. appendiculata* y *Hammerschmidtella diesingi* es muy diferente, es probable que funcionen de manera diferente. *Leidyneema* y *Hammerschmidtella* se alimentan de fracciones diferentes de los contenidos del colon del hospedador (Hominick *et al.*, 1973; Adamson *et al.*, 1993). Estas diferencias en el tipo de alimentación se ven correlacionadas con la morfología del tracto digestivo anterior de

ambas especies. *Leidynema* tiene un largo y amplio estoma reforzado, y separado de la faringe por un mecanismo valvular. Esta estructura es adecuada para el desarrollo de presiones negativas para tirar la materia particulada dentro del estoma. Entonces, la apertura del metacorpus crearía una presión negativa adicional para mover el material hacia el procorpus. Finalmente, el material alcanza el intestino y el ciego. Las partículas de alimento sugieren que el ciego puede ser una adaptación para tratar partículas grandes durante la ingesta, lo que permite una degradación parcial del material antes de que alcance el intestino (Hominick *et al.*, 1973). Por el contrario, en *Hammerschmidtella diesingi* se ha reducido el estoma, una gran apertura de la boca, una abertura estrecha en la faringe custodiada por dientes, y un fuerte pseudobulbo muscularizado. Estas estructuras sugieren un eficiente y fuerte mecanismo de bombeo, lo que permite el paso de fluido y partículas diminutas y la eliminación de partículas de gran tamaño. *L. appendiculata* es un alimentador indiscriminado, consume grandes cantidades de partículas derivadas de los residuos no digeridos de la dieta del hospedador. *Hammerschmidtella diesingi* consume probablemente las bacterias presentes en el intestino del hospedador. Las dos especies de Thelastomatidos descritas muestran ausencia de competencia por el alimento en el tracto digestivo del insecto y provienen de géneros morfológicamente similares, pero bien diferenciados (Adamson & Noble, 1993). En nuestra cucaracha se observó que *L. appendiculata* comparte con *Hammerschmidtella* sp. el intestino posterior del hospedador que parasitan y se diferencian entre otros caracteres por el esófago Hominick *et al.*, (1973), es probable que estas dos especies se alimenten de manera diferente y que no compitan entre si por el espacio y el alimento, lo que permitiría el nivel alto de prevalencia encontrado en *P. fuliginosa*.

Según Jex *et al.* (2006) la familia Thelastomatidae, muestran un apreciable bajo nivel de especificidad de hospedador a nivel familia. En nuestro trabajo confirmamos con el análisis filogenético que ambos nematodos se hallan presentes en diferentes especies de cucarachas, como son *P. americana*, *P. fuliginosa* y *B. orientalis*, estas tres especies pertenecen a la familia Blattidae.

La taxonomía clásica del género se basa en criterios morfológicos y morfométricos, sin embargo en la actualidad las técnicas de biología molecular son utilizadas para identificar y caracterizar la variabilidad genética entre las especies de nematodos. En general, la caracterización morfológica y morfométricas utilizadas para

determinar las especies de nematodos se ven complementadas por los análisis moleculares. En este trabajo de investigación se detallan las características morfométricas de dos nematodos pertenecientes a la familia Thelastomatidae correspondientes al género *Hammerschmidtella* y a la especie *L. appendiculata*. La caracterización molecular consistió en la amplificación del gen nuclear (28S ADNr), obteniendo un fragmento de aproximadamente 220 pb, lo cual coincide con el trabajo realizado por Chaudhary *et al.*, 2011. La secuenciación de la región 28S ADNr permitió una comparación con las secuencias obtenidas de otros linajes de ambos géneros de nematodos y especies emparentadas.

El género *Leidynema* Schweneck, (Travassos, 1929) tiene como especie tipo a *L. appendiculata* Leidy, 1850 (Chitwood, 1932) tanto los aspectos morfológicos y morfométricos coincidieron con los que definen a la especie *L. appendiculata* en los trabajos de Adamson y Van Waerebeke (1992a) y Shah (2007); también se comparó con el trabajo de Ozawa *et al.*, (2014). En el presente estudio, se ha detallado la región cefálica al MEB, donde se observan los dos anillos cefálicos, las papilas labiales y los anfidios, la región posterior de las hembras donde se detallan la ubicación de los fasmidios. Detalle de la región posterior del macho al MEB, donde se observan las papilas caudales con forma y disposición características de la especie. Es el primer registro al microscopio de barrido de esta especie. Este nematodo se encuentra estrechamente relacionado con diferentes especies de cucarachas en distintas partes del mundo (Tabla 3). El divertículo intestinal o ciego característico de las hembras adultas permite que este género sea fácilmente identificable dentro de los thelastomatidos, se genera como un pequeño brote en la región anterior del intestino en la fase larvaria de las hembras, y el hecho de que se dirige posteriormente es una característica distintiva dentro del Phylum Nematoda (Chitwood & Chitwood, 1950). Los resultados del análisis de la morfología, las mediciones realizadas a los ejemplares y los resultados del análisis molecular nos permiten confirmar que la especie de nematodo presente en el intestino de *P. fuliginosa* es *Leidynema appendiculata*, con pequeñas variaciones en la medición de varias partes del cuerpo con la especie tipo, esto podría ser debido a la presencia del parásito en diferentes hospedadores y nichos ecológico.

En la actualidad en el género *Hammerschmidtella* Chitwood, 1932 se reconocen diez especies como miembros válidos de este género. Siete de estas especies son descritas por Adamson y van Waerebecke (1992a) en la revisión de la familia

Thelastomatidae. Jex *et al.*, 2005 describe a *H. hochi*. Camino *et al.*, (2012 a) describe a *H. eltalaensis* y a *H. laplatae* (Camino *et al.*, 2013b). Al comparar nuestra especie con *H. diesingi* (Hammerschmidt, 1838) Chitwood, 1932, encontramos varias diferencias: en nuestra especie la hembra tiene la vulva ligeramente protuberante que se ubicada en el tercio anterior del cuerpo. En la hembra de *H. diesingi* la vulva es una pequeña hendidura transversal en la parte anterior del cuerpo. Sin embargo, la ubicación es similar en ambas hembras, posterior a la base del esófago. En la región cefálica de la hembra, se observa la boca triangular, con 3 dientes y rodeada por ocho labios similares en tamaño dispuestos en el primer anillo cefálico con dos anfidios sobresalientes ubicados en dos de los 8 interlabios (Fig. 10 a y b). En el trabajo de Yu *et al.*, 1986 se detalla la región cefálica de la hembra de *H. diesingi* al MEB y se observa un segundo anillo cefálico, estrecho de apariencia arrugado entre el primer anillo cefálico y el primer anillo somática. Sin embargo en las imágenes de la figura 10 (a y b) no se aprecia el segundo anillo cefálico descrito por Yu. Shah 2007, describe la cola de *H. diesingi* con la presencia en la punta de un capuchón. En nuestros ejemplares no se observó dicho capuchón en la punta de la cola de la hembra. En la región posterior del macho se observan 4 pares de papilas caudales. La extremidad posterior del macho no termina de forma truncada sino que continua y se afina formando un “cono genital” (Fig. 11b) en cuyo extremo se encuentra la cloaca. El macho presenta cuatro pares de papilas: (1) un par de grandes papilas sub-ventral pre-anales. (2) Un par de grandes papilas pre-anales latero-ventrales. Un par de pequeñas papilas adanales ubicadas en el extremo del cono genital, es decir estas papilas se ubican paralelas a la cloaca. (4) Una papila ventral dúplex en la base del apéndice caudal. La región posterior del macho es diferente a la del macho de *H. diesingi*, quien carece de cono genital ya que el extremo del cuerpo termina truncado (Yu *et al.*, 1986). El macho de *H. diesingi* presenta 4 pares de papilas el segundo par es adanal y en nuestra especie son preanales. Es interesante notar que la disposición de las papilas es similar a *H. diesingi*, con la excepción del 2 par, es como si la región posterior de *H. diesingi* se alargara y afinara formando el cono.

Las características de las diez especies del género *Hammerschmidtella* son recopiladas por Camino *et al.*, (2013b). Al comparar con nuestra especie encontramos varias diferencias. Las diferencias con *H. diesingi* ya fueron explicadas anteriormente. *Hammerschmidtella acreana* Kloss, 1966, puede separarse de nuestra especie en tener un metacarpus que está más desarrollado que el bulbo basal y las papilas genitales del

macho son todas de posición postanal (Kloss, 1966). *H. andersoni* Adamson & Nasher, 1987, se diferencia por la apertura bucal de la hembra y el macho presenta cinco pares de papilas genitales y la presencia de un pequeño gubernáculo (Adamson & Nasher, 1987). *H. basiri* Singh y Kaur, 1988 se distingue por presentar una cutícula gruesa anillada a lo largo de todo el cuerpo, el poro excretor abre a nivel del istmo. El macho tiene 2 pares de papilas caudales. *H. eltalaensis* Camino y Villalobos, 2012 se caracteriza por tener la cutícula anillada, sin ala lateral, boca con tres labios dentados y ocho papilas labiales, cápsula bucal corta con cuatro dientes móviles, el macho con las papilas genitales dispuestos en un par de papilas preanales pequeña, y dos papilas postanales, un par en la base del apéndice caudal (Camino *et.al.*, 2012 a). *H. hochi* Jex, Schneider, Rose & Cribb, 2005, se diferencia por la ausencia de alas laterales en la hembra, huevos en forma de pera, un anillo nervioso posterior al metacarpus. *H. manohari* Rao, 1958, se puede distinguir por la cutícula anillada en toda la longitud del cuerpo, el anillo rodeando al metacarpus, y el macho presenta 4 pares de papilas con diferente disposición en comparación a nuestra especie.(Rao, 1958). *H. neyrai* Serrano-Sánchez, 1945 se caracteriza por la ausencia de alas laterales, y el macho presenta 3 pares de papilas. *H. singhi* Rao & Rao, 1965, el macho presenta 3 pares de papilas.

Por lo expuesto anteriormente consideramos que nuestra especie podría ser una nueva especie dentro del género *Hammerschmidtella* Chitwood, 1932. Si bien consideramos que la especie *Hammerschmidtella* sp. no pertenece a ninguna de las especies descritas hasta el momento dentro del mencionado género. Para poder definir a nuestra especie como nueva especie será necesario secuenciar el segmento completo del gen 28S ADNr y comparar con las especies que se encuentran en el Genbank.

Conclusiones finales: en la Argentina, los estudios filogenéticos moleculares de nematodos de la familia Thelastomatidae se encuentran todavía en una etapa temprana solamente se encuentra el trabajo realizado por Blanco *et. al.* (2012). Nuestro trabajo pretende ampliar este registro. Además, existe escasa información a nivel mundial sobre los nematodos presentes en *P. fuliginosa*, el único registro pertenece a Japón (Ozawa *et al.*, 2014). Estos autores citan en la cucaracha *P. fuliginosa* una única especie de nematodo que fue identificada como *L. appendiculata*. En nuestro estudio encontramos que *P. fuliginosa* estaba parasitada por dos especies diferentes de nematodos. En consecuencia, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación son el primer registro de una doble infección en esta cucaracha. Es la primer cita de *L. appendiculata*

para la región Neotropical y es la primer cita a nivel mundial del genero *Hemmermidtella* en la cucaracha *P. fuliginosa*. La escasa información a nivel mundial con respecto a esta cucaracha puede estar relacionada con la distribución, ya que presenta una distribución centrada en regiones de clima cálido y húmedo. Se ha citado en Asia, Europa, Australia, América del Norte y del Sur. En Argentina, se ha citado en la provincia de Buenos Aires y Tucumán (Crespo & Valverde, 2008), invade periódicamente los domicilios, es una cucaracha netamente peridomiciliaria, en el muestreo realizado encontramos que principalmente invade los hogares entre los meses de octubre a abril. Si bien el alineamiento y análisis filogenético confirmaron la identidad taxonómica de los aislamientos analizados. Sería necesario secuenciar el segmento completo D2/D3 del gen ribosomal 28S que contiene 800pb para confirmar los resultados filogenéticos obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

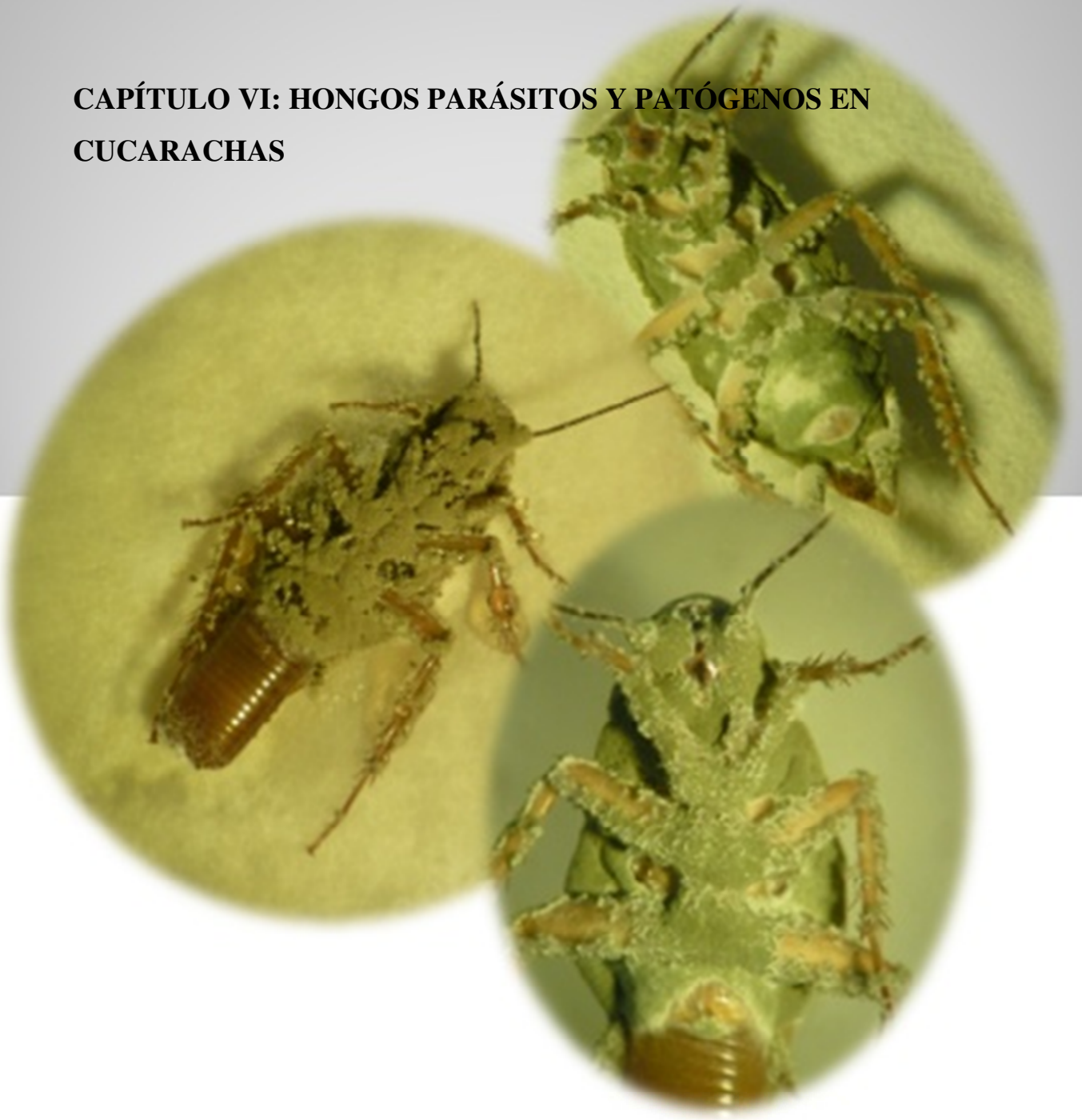
- Adamson M.L. (1989). Evolutionary biology of the Oxyurida (Nematoda): biofacies of a haplodiploid taxon. *Adv. Parasitol.* 28:175–228.
- Adamson M.L. & Noble H. (1993). Interspecific and intraspecific competition among pinworms in the hindgut of *Periplaneta americana*. *J. Parasitol.* 79: 50-56.
- Adamson M.L. & Van Waerebeke D. (1992a). Revision of the Thelastomatoidea, Oxyurida of invertebrate hosts I. Thelastomatidae. *Syst. Parasitol.* 21: 21-63.
- Adamson M.L. & Van Waerebeke D. (1992b). Revision of the Thelastomatoidea, Oxyurida of invertebrate hosts: II. Travassosinemitidae, Protrelloididae and Pseudonymidae. *Syst. Parasitol.* 21:169–88.
- Adamson M.L. & Van Waerebeke D. (1992c). Revision of the Thelastomatoidea, Oxyurida of invertebrate hosts: III. Hystriognathidae. *Syst. Parasitol.* 22:111–30.
- Blanco M.V., Lax P., Rondan Dueñas J.C., Gardenal C.N. and Doucet M.E. (2012). Morphological and molecular characterization of the entomoparasitic nematode *Hammerschmidtella diesingi* (Nematoda, Oxyurida, Thelastomatidae). *Acta Parasitol.* 57(3): 302-310.

- Burnell A.M. & Stock S.P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. *Nematology* 2: 31-42.
- Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M. & Shostak A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own term: Magolis *et al.* Revisited. *J. Parasitol.* 83:575-583.
- Camino N.B. & Gonzales S.E. (2012a). Cuatro especies simpátricas de Thelastomatidae (Nematoda) parásitas de la cucaracha americana *Periplaneta americana* (L.) (Blattodea, Blattidae) en La Plata, Argentina. *Neotrop. Helminthol.* 6(2): 239-246.
- Camino N.B. & Quelas, M.A. (2008). Descripción de *Thelastoma domesticus* sp. nov. (Oxyurida, Thelastomatidae) parásita de ninfas *Periplaneta americana* (Blattodea, Blattidae) en Argentina. *Iheringia, Ser. Zool.* 98:24-27.
- Camino N.B. & De Villalobos C. (2012b). A new species of *Hammerschmidtella* Chitwood, 1932 (Nematoda, Thelastomatidae) parasite of the brown cockroach *Periplaneta brunnea* Burmeister, 1838 (Blattodea, Blattidae) from Argentina . *Acta Parasitol.* vol. 57: 61-66.
- Camino N.B. & De Villalobos C. (2013a). A new species of *Protrellus* Cobb, 1920 (Nematoda, Thelastomatidae) parasite of the field cockroach *Blattella vaga* Hebard, 1919 (Blattodea, Blattidae) from Catamarca, Argentina. *Acta Parasitol.* 58(1): 98-104.
- Camino N.B., Ricuzzi M. and López Costa L. (2013b). Una nueva especie de Thelastomatidae *Hammerschmidtella laplatae* sp. n. (Nematoda) parásita de la cucaracha *Periplaneta americana* (L.) (Blattodea, Blattidae) de Argentina. *Neotrop. Helminthol.* 7(1): 95-103.
- Chaudhary A., Pal S., Malti and Hridaya Shanker Singh. (2011). Genomic DNA Sequence of *Leidynema appendiculata* from Meerut, U.P., India. *Asian J. Anim. Sci.* 5:243-255.
- Cherry T., Szalanski A.L., Todd T.C. and Powers T.O. (1997). The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). *J. Nematol.* 29, 23–29.
- Chitwood B.G. (1932). Asynopsis of the nematodes parasitic in insects of the family Blattidae. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, vol. 5: 14-50.
- Chitwood B.G. & M.B. Chitwood. (1950). An introduction to nematology. Revised edition. Monumental Printing Co., Baltimore, U.S.A. 213 pp.

- Doucet M.E., Bertolotti M.A., Cagnolo S.R., Lax P. (2008). Nematodos entomofílicos de la provincia de Córdoba, Argentina. En *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*. Ed. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. vol. 62 : 263-263.
- Dowling T.E., Moritz C., Palmer J.D. and Rieseberg L.H. (1996) Nucleic acids III: analysis of fragments and restriction sites. In: Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. (eds) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pp. 249–320.
- Dorris M., Viney M.E. and Blaxter M.L. (2002) Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *Int. J. Parasitol.* 32, 1507–1517.
- Goloboff P.A., Farris J.S. and Nixon K.C. (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*. 24:774-786.
- Hominick W.M. & Davey K.G. (1973). Food and the spatial distribution of adult female pinworms parasitic in the hindgut of *Periplaneta americana* L. *Int. J. Parasitol.* vol. 3:759-771.
- Jex A.R., Schneider M.A, Rose H.A. & Cribb T.H. (2005). The Thelastomatoidea (Nematoda: Oxyurida) of two sympatric Panesthiinae (Insecta: Blattodea) from south-eastern Queensland, Australia: taxonomy, species richness and host specificity. *Nematol.* 7: 543-575.
- Jex A. R., Schneider M. A., Rose H. A. and Cribb T.H. (2006). The importance of host ecology in thelastomatoid (Nematoda: Oxyurida) host specificity. *Parasitology International* 55: 169–174.
- Ozawa S, Vicente C.S., Sato K., Yoshiga T., Kanzaki N., Hasegawa K. (2014). First report of the nematode *Leidynema appendiculata* from *Periplaneta fuliginosa*. *Acta Parasitol.* 59(2):219-28.
- Poinar G.O. Jr. (1990). Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Gaugler, R. & H. Kaya (eds.). CRC Press. B. Raton, Florida. p. 54.
- Rao P.N. (1958). Studies on the nematode parasites of insects and other arthropods. *Arq. Mus. Nac.* 46: 33-84.
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.

- Shah M.M. (2007). Some studies on insect parasitic nematodes (Oxyurida, Thelastomatoidea, Thelastomatidae) from Manipur, northeast India. *Acta Parasitol.* 52: 346–362.
- Skrjabin K.I., Schikhobalova N.P. & Lagodovskaya E.A. (1966). Oxyurids of invertebrates. Moscow, (ed) Nauka.
- Stock S.P. (2002). Entomopathogenic nematode diversity in South America: opportunities for exploration. En: Proceedings of the VIII International Colloquium o Invertebrate Pathology and Microbial Control, Foz do Iguazu, Brazil, p. 105-109.
- Stock P. (2009). Molecular Approaches and the Taxonomy of Insect-parasitic and Pathogenic Nematodes. En *Insect Pathogens Molecular Approaches and techniques* (p. 417) by S. Patricia Stock, John Vandenberg, Itamar Glazer, and Noël Boemare (eds.) Publisher: CAB International, Oxfordshire (UK).
- Travassos L. (1929). Contribução preliminar a systematica dos nematodeos dos arthropodos. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz.* vol. 5, pp. 9-25.
- Walton A.C. (1927). A revision of the nematodes of the Leidy Collections. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences, Philadelphia*, vol. 76: 49-163.
- Yu X., Crites J.L. (1986). Scanning electron microscope studies on *Hammerschmidtella diesingi* (Nematoda: Oxyurida). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 53: 117.120

CAPÍTULO VI: HONGOS PARÁSITOS Y PATÓGENOS EN CUCARACHAS



Resultados parciales de este capítulo fueron publicados en las revistas: Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. , J. Economic.Entomol y un trabajo enviado a Biocont Scien technol. Citados en bibliografía Gutierrez A.C. *et al.*

INTRODUCCIÓN

Los hongos productores de ascos, ectoparásitos obligados, que crecen y fructifican sobre artrópodos vivos son un grupo especializado que se incluyen en el orden Laboulbeniales (Ascomycota). Presentan un “sistema hifal compacto” denominado talo, que está formado en general por un receptáculo que sostiene apéndices y los elementos sexuales masculinos son los anteridios y los femeninos ascogonios, que una vez fecundados desarrollan los meiosporangios, tipo ascos, que quedan encerrados en el interior de los ascomas de aspecto peritecial (Santamaria, 1998). El Subórden Herpomycetinae Tavares, 1981, es monogénico. *Herpomycetes* Thaxter, 1902 es el género que incluye a 25 especies todas parásitas de Blattodea (cucarachas), son especies dioicas, es decir, desarrollan un talo masculino y uno femenino (Santamaria, 2003). Las infecciones de estas especies de hongos se diseminan por contacto entre las cucarachas y obtienen el alimento del hospedador a través de un haustorio tubular, que se extiende por la cutícula de las cucarachas y se expande en un bulbo grande entre las células epidérmicas subyacentes causando una dermatitis que no es patogénica (Roth & Willis, 1960; Richards & Smith, 1956); sin embargo, existe evidencia que en las crías de laboratorio pueden ocasionar graves problemas (Gemenio *et al.*, 2004). En la República Argentina, las citas de Laboulbeniales sobre cucarachas son escasas, los únicos trabajos citados pertenecen a Spegazzini (1915, 1917).

Los hongos entomopatógenos se encuentran dentro del Orden Hypocreales en el Phylum Ascomycota, actúan principalmente por contacto, penetrando a través de la cutícula del insecto hospedador por fuerzas mecánicas y por acción enzimática con el fin de colonizar el hemocele del insecto (Gupta *et al.*, 1991; St. Leger *et al.*, 1991). Una vez en el interior del insecto, los hongos se desarrollan generalmente como células de tipo levaduriforme, llamadas blastosporas (Ascomycota), cuerpos hifales (Entomophthorales) o protoplastos, que se multiplican y se dispersan rápidamente por el interior del insecto (Boucias & Pendland, 1998). Estas estructuras fúngicas, que carecen de pared celular, evitan o sobrepasan la respuesta inmune del insecto ya que no son reconocidas por la población de hemocitos del insecto (Tanada y Kaya, 1993). Después de la muerte, si las condiciones de humedad relativa son altas, las estructuras fúngicas logran atravesar nuevamente el tegumento para emerger hacia el exterior del insecto.

Generalmente, la emersión del hongo ocurre por regiones menos esclerosadas de la cutícula, como las membranas intersegmentales o los espiráculos (Lecuona, 1996a).

Hay pocas citas a nivel mundial de hongos entomopatógenos infectando cucarachas, entre ellas *Cordyceps blattae*, sobre *B. germanica* y fue siendo altamente patogénico (Roth & Willis, 1960); en Tailandia se detectaron ninfas de cucarachas silvestres (Blattodea) infectadas con *Hymenostilbe ventricosa* (Hywel-Jones, 1995); estas especies fúngicas, a pesar de ser altamente patogénicos son difíciles de cultivar *in-vitro*. Otro grupo de hongos entomopatógenos, que si pueden ser cultivados *in-vitro*, pueden ser considerados una alternativa al control químico de cucarachas; los estudios realizados en los últimos años se realizaron con hongos aislados de otros insectos, por ejemplo varios trabajos determinaron los efectos de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals.- Criv.) Vuill. (Sordariomycetes: Hypocreales: Cordycipitaceae) y *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Sordariomycetes: Hypocreales: Clavicipitaceae) en *B. germanica* y *P. americana*, habiendo sido evaluadas su virulencia y rango hospedador (Murali Mohan *et al.*, 1999; Quesada Moraga *et al.*, 2004; Hubner-Campos *et al.*, 2013). Otros autores reportaron estudios sobre la evaluación de los efectos de *B. bassiana* sobre *B. germanica* (Pachamuthu *et al.*, 1999; Zurek *et al.*, 2002) asimismo algunos investigadores también informaron acerca de la virulencia, la transmisión, el uso de cebos y la susceptibilidad diferencial de ninfas y adultos de *B. germanica* a *M. anisopliae* (Lopes & Alves, 2011). Hay varios factores que influyen en la susceptibilidad diferencial de los insectos hacia los hongos, una de las causas podría ser la estructura superficial y la composición química de la cutícula del hospedador, estas diferencias, podrían afectar la invasión de los propágulos fúngicos a la cutícula (Boucias & Pendland 1984). La cutícula de los insectos es la primera barrera contra el ingreso de los patógenos, es así que la adhesión y la penetración de los conidios, a través de la misma, son los factores limitantes claves en la colonización del insecto. Sumado a la presencia de compuestos anti-fúngicos en la cutícula, así como a la eficiencia de las reacciones de defensas celulares y humorales del hospedador, van a determinar el éxito o no del hongo para invadir el insecto (Vilçinskis & Götz 1999).

Estructuralmente la cutícula está formada por varias capas, que de afuera hacia adentro son: la epicutícula que comprende fibrillas de quitina incrustado en matriz proteica, la procutícula que incluye proteínas de fenol-estabilizado y la epidermis. Considerando que la composición de proteína y quitina de la procutícula del

insecto parece ser similar en todos los grupos, los componentes epicuticulares son extremadamente heterogéneos y por lo tanto, tienen el potencial para responder a diferentes patógenos, en particular en los insectos (Gołębiowski *et al.*, 2011). La epicutícula está cubierta por una capa cerosa que contiene cantidades variables de ácidos grasos, lípidos y esteroides (Anderson, 2004). Los lípidos epicuticulares juegan un papel importante en la protección de los insectos contra la desecación y están involucrados en la comunicación química entre las especies de insectos, así como entre los estados de desarrollo y sexos de una misma especie (Gołębiowski *et al.*, 2011; Singer, 1998). También es importante en la quimiotaxonomía de insectos. Los lípidos libres epicuticulares de insectos cambian de composición y cantidad, dependiendo de la especie y de su etapa de desarrollo (Gołębiowski *et al.* 2011). Mientras que la composición lipídica de la cutícula de algunos insectos ya se conoce (Lockey, 1988), no hay suficiente conocimiento acerca de la composición en las cucarachas y cómo afecta ésta, a la acción de los hongos entomopatógenos.

OBJETIVOS

Objetivos generales

Aislar e identificar hongos parásitos y patógenos de cucarachas.

Objetivos específicos

- Evaluar la patogenicidad de los aislamientos nativos de los hongos entomopatógenos aislados de cucarachas y de otros insectos.
- Determinar la dosis letal media de conidios del aislamiento que haya presentado la mayor agresividad sobre ninfas y adultos de cucarachas (Blattodea: Blaberidae).
- Iniciar la producción *in-vitro* de los hongos que hayan presentado mayor patogenicidad.
- Evaluar el tiempo de desarrollo de la infección causada por el hongo *Metarhizium anisopliae sensu lato* en la hemolinfa de las cucarachas.
- Iniciar el estudio acerca de los ácidos grasos de la cutícula de cinco especies de cucarachas.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento y caracterización de hongos parásitos de cucarachas.

Los insectos con signos de infección fúngica fueron transferidos a etanol 70° para su posterior examen e identificación del hongo. Los hospedadores fueron observados bajo el microscopio binocular estereoscópico (Zeiss Stemi DV4). Para separar el hongo, las cucarachas se colocaron sobre un papel “tisú” humedecido con agua destilada estéril, se sujetó con una mano y con la otra se retiraron los talos cuidadosamente con una aguja entomológica de punta fina. Se realizaron dos preparados, el primero consistió en los talos montados en Azul de algodón-Lactofenol de Amann (0,001 % p/v) (ver Anexo), entre porta y cubre objetos y se examinaron bajo un microscopio óptico Olympus Bx41. El segundo, fue un preparado permanente, que fue realizado siguiendo el método descrito por Benjamin (1971, 1986) y Majewski (1994): los talos se colocaron en un portaobjetos con una gota de mezcla 1:1 de líquido de Hoyer (ver Anexo) y agua destilada, para limpiar la superficie de los mismos. A continuación, en un portaobjetos limpio se colocó una línea de Hoyer; donde se incorporaron los talos uno a uno y quedaron adheridos. Finalmente, se cubrió la preparación con un cubreobjetos sobre el que previamente colocamos una gota de Azul de algodón-Lactofenol de Amann (0,001 % p/v). Después de unos días se sellaron los preparados con laca comercial transparente para uñas. Los preparados fueron etiquetados y los análisis morfológicos y las mediciones se realizaron mediante observaciones bajo un microscopio óptico Olympus Bx41 con cámara incorporada Lumenera Infinity 1; se utilizó para el análisis de las imágenes capturadas el software libre IMAGE J.

Relevamiento e identificación de hongos patógenos de cucarachas

La prospección de hongos patógenos de cucarachas fue efectuada en cucarachas urbanas recolectadas en la ciudad de La Plata. Se realizaron muestreos de cucarachas silvestres en la reserva de Magdalena “El Destino” (Fundación Pearson). Se efectuó un

muestreo ocasional en el Parque nacional “El Palmar” de Entre Ríos, si bien es un punto que cae fuera de la zona geográfica fijada para la tesis, consideramos de gran importancia describir los hallazgos que si forman parte de los objetivos planteados para este trabajo.

El muestreo fue realizado como se detalla en el capítulo I (p. 41). Se realizó la recolección de insectos muertos con evidentes infecciones fúngicas, mediante la utilización de pinzas entomológicas. En el laboratorio se realizó la observación bajo microscopio binocular estereoscópico (Zeiss Stemi DV4) y preparados microscópicos bajo microscopio óptico (Olympus Bx41) donde se montó una pequeña porción de micelio en Azul de algodón-Lactofenol de Amann (0,001 % p/v) (ver Anexo). Los insectos infectados y los preparados microscópicos de las especies fúngicas fueron depositados como material de herbario de referencia en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE).

Los insectos recolectados se llevaron al laboratorio dónde fueron mantenidos bajo condiciones de hacinamiento, para estimular la expresión de las infecciones fúngicas latentes que pudieran haber adquirido en el campo (Shah *et al.*, 1997).

Aislamiento y caracterización de hongos patógenos de cucarachas

Aislamiento a partir del insecto infectado

Las cucarachas con síntomas de infección fúngica fueron llevadas al laboratorio donde se realizó el aislamiento directo en una mesada limpia, con dos mecheros de alcohol, para mantener un ambiente estéril, y con el uso de alfileres entomológicos previamente esterilizados, se tomó una pequeña cantidad de micelio a partir del insecto infectado y se inoculó en cápsulas de Petri conteniendo medio de cultivo Sabouraud dextrosa agar suplementado con extracto de levadura 1 % (SDYA). Los medios de cultivo contenían antibióticos (Gentamicina y Cloranfenicol) (ver Anexo) para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes. Luego, las cápsulas fueron incubadas a 25° C en oscuridad durante 10 a 15 días en estufa de cultivo. Una vez obtenidos los aislamientos puros, estos fueron transferidos a cajas de Petri con medio de cultivo SDYA 1% y se preservaron papel, agua y glicerol hasta su utilización.

Aislamientos monospóricos

Los aislamientos fueron cultivados en medio Sabouraud dextrosa agar + extracto de levadura 1% (SDAY 1%), e incubado a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ y $70 \pm 5\%$ humedad relativa (HR). A partir de cultivos de 15 días, los conidios fueron raspados con un ansa de vidrio estéril (Drigalsky) y recolectados en un tubo de plástico estéril (45 cm^3) que contenía 5 ml de Tween 80 (Polisorbato de sodio) 0,01% (v / v). La suspensión de conidios fue agitada en vórtex durante 5 minutos, y se filtró con una tela de Voile esterilizada en autoclave. A partir de la suspensión homogénea de conidios lograda, se realizaron seis diluciones seriadas (1/10). Las concentraciones de conidios se determinaron utilizando una cámara de Neubauer. Por último se sembró 0,1 ml de la última dilución, con una concentración aproximada de 1×10^2 conidios/ml, en cápsulas de Petri de 9cm de diámetro (3 por cada aislamiento) conteniendo medio de cultivo SDAY 1%. Las cápsulas fueron incubadas a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ en oscuridad. Entre las 24 y las 48 horas de incubación se observó el desarrollo de las unidades formadoras de colonias (UFC), las cuales fueron transferidas individualmente a cajas de Petri con medio de cultivo SDYA 1% y papa dextrosa agar (PDA) (ver Anexo) mantenidas en incubadora. Esta técnica fue realizada mediante una adaptación del método citado por Lecuona (1996b).

Procedimientos con cultivos fúngicos y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos

Para cada una de las metodologías aplicadas los cultivos fúngicos fueron realizados bajo condiciones de esterilidad (bajo cámara de flujo laminar) y los medios de cultivo como los materiales fueron esterilizados en autoclave tipo Chamberlain a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

La caracterización morfológica de los aislamientos fúngicos se efectuó observando los caracteres macroscópicos y microscópicos. Los primeros consistieron en registrar el aspecto y el crecimiento radial de las colonias, la tasa de crecimiento y porcentaje de germinación de los conidios y en cuanto a los microscópicos se registró la

forma y dimensiones de los conidios, realizando las mediciones correspondientes. Luego estas descripciones se compararon con claves taxonómicas. Para la identificación de las especies de Ascomycota se utilizaron las claves de Humber (2012).

Descripción macroscópica

A partir de los aislamientos monospóricos obtenidos de cada cepa fúngica, se observó el tipo de borde, el aspecto y color del envés y revés de la colonia. Asimismo, se midió el diámetro de las colonias luego de 10 días de incubación a 25° C en condiciones de oscuridad y se estimó la tasa de crecimiento como el diámetro de la colonia por el tiempo de incubación (mm/día).

Ensayo de viabilidad:

Para determinar el porcentaje de germinación de cada aislamiento se realizó el ensayo de viabilidad modificado de Lane *et al.*, (1988). Este ensayo consistió en realizar una suspensión de conidios en Tween 80 (Polisorbato de Sodio) 0,01 % (v/v), y ajustar su concentración a 1×10^4 conidios/ml mediante la utilización de un hemocitómetro. A su vez, se acondicionó una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril y conteniendo en su interior un portaobjetos esterilizado con 500 µl de medio de cultivo SDYA (espesor de 2mm) (Fig. 1). Luego, se inocularon 100 µl de la suspensión de conidios sobre la capa de medio de cultivo SDYA y se distribuyó homogéneamente con ayuda de una espátula de Drigalsky. Cada cápsula de Petri se colocó en una cámara incubadora a 25° C en oscuridad durante 24 hs y se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados en el microscopio con contraste de fases (400x) (Olympus Bx41). Se consideró un conidio germinado cuando el tubo de germinación alcanzó la mitad de la longitud de la espora. Para cada aislamiento se evaluó el porcentaje de germinación por triplicado y en cada cámara de viabilidad se contó un total de 600 conidios. Los resultados se expresaron promediando los valores obtenidos para cada réplica (media \pm ES).



Figura 1. Cámara de viabilidad: Caja de Petri conteniendo 2 portaobjetos limpios ubicados perpendicularmente, donde uno de ellos tiene una delgada capa de medio de cultivo SDYA. En la base se encuentra un papel de filtro humedecido con agua destilada estéril.

Determinación del crecimiento radial y tasa de crecimiento:

A partir de cultivos jóvenes de cada aislamiento fúngico (10 días de incubación a 25 °C) se cortaron cilindros de 4 mm de diámetro mediante la utilización de un sacabocados. Cada cilindro fue ubicado individualmente en el centro de una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro que contenía SDYA más 1% de extracto de levadura estéril. Cada aislamiento fúngico fue ensayado por triplicado y conservado en cámara incubadora a 25 °C en condiciones de oscuridad durante 10 días. Diariamente, se midió el diámetro de la colonia (Figura 8) empleando una regla milimetrada y los valores obtenidos fueron indicados como crecimiento radial (Lacey y Brooks, 1997). El crecimiento radial definitivo de cada aislamiento se expresó promediando los resultados de las tres réplicas efectuadas (media \pm ES). La tasa de crecimiento se estimó mediante la siguiente fórmula:

Tasa de crecimiento diaria = (diámetro final – diámetro inicial)/ número de días

Descripción microscópica

A partir de cultivos fúngicos esporulados se realizaron preparados ópticos montados en Azul de algodón-Lactofenol de Amann (0,001 % p/v) (Anexo) para visualizar la forma y dimensiones de los conidios, células conidiógenas (fiálides) e hifas de cada aislamiento. Las medidas fueron tomadas usando un microscopio óptico con contraste de fases (400x) Olympus Bx41 con cámara incorporada Lumenera Infinity 1 y se utilizó para el análisis de las imágenes capturadas el software libre IMAGE J. Las mediciones se expresaron en micrómetros (μm), para cada aislamiento se midieron 30 unidades como mínimo, estableciéndose la media y la desviación estándar, con los valores máximos y mínimos entre paréntesis.

Análisis estadísticos

Los valores de porcentaje de germinación de los conidios y la tasa de crecimiento fueron analizados estadísticamente con el programa Statgraphics Centurion 15.2 program (StatPoint, Inc. 2007). Los valores de porcentaje de germinación de los conidios fueron transformados con la función arcoseno. Las diferencias entre ellas se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con nivel de significancia del 95%. Finalmente, se realizó un test de Tukey (HSD) para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

Preservación de los cultivos fúngicos

Los aislamientos fúngicos obtenidos fueron depositados en la colección de hongos entomopatógenos del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) (CONICET-UNLP), La Plata, Argentina.

Las técnicas empleadas para preservar los cultivos en la colección micológica del CEPAVE fueron las siguientes:

En glicerol 10 % estéril

A partir de un cultivo esporulados se cortaron cubos de 1 cm³ y se colocaron dentro de frascos estériles de 1,5 ml conteniendo glicerol 10% estéril. Estos frascos fueron mantenidos a -20° C (López Lastra *et al.*, 2001).

En agua destilada estéril

Se cortaron cubos de 1 cm³ de un cultivo esporulado y se colocaron dentro de tubos de centrífuga de 15 ml de polipropileno esterilizados (“tubo Falcon”) conteniendo 10ml de agua destilada estéril. Cada tubo se conservó en la heladera a 4° C.

En papel de filtro esterilizado

Sobre el micelio de un cultivo esporulado se colocaron tiras de papel de filtro previamente esterilizado y secado. Estos cultivos fueron mantenidos a 25° C durante 3 días para favorecer la adhesión de los conidios al papel. Luego, se removió el papel de filtro con ayuda de una pinza esterilizada y se dejaron secar al aire por 30 minutos dentro del flujo laminar. Los papeles de filtro conteniendo los conidios fueron ubicados individualmente en Eppendorf esterilizados y luego conservados en la heladera a 4° C.

Transferencias en cultivo o “repiques” sucesivos

Los cultivos fúngicos esporulados presentes en placas de Petri o en tubos de vidrio (“pico de flauta”) se conservaron en la heladera a 4° C.

Evaluación de la patogenicidad de los hongos entomopatógenos

Cría de insectos para Bioensayos

Las cucarachas que se utilizaron en los bioensayos se criaron como se describe en el capítulo I.

Cultivo fúngico y preparación del inóculo

Para la realización de los bioensayos, los hongos entomopatógenos utilizados fueron repicados de la colección de hongos entomopatógenos del CEPAVE, a partir de hongos aislados de cucarachas y de otros insectos. Los aislamientos fueron cultivados en medio Sabouraud dextrosa agar + extracto de levadura 1% (SDAY 1%) (ver Anexo), e incubado a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ y $70 \pm 5\%$ humedad relativa (HR). A partir de cultivos de 15 días, los conidios fueron raspados con un ansa de vidrio estéril y recolectados en un tubo de plástico estéril (45 cm^3) que contenía 5 ml de Tween 80 (Polisorbato de sodio) 0,01% (v / v). La suspensión de conidios fue agitada en vórtex durante 5 minutos. Las concentraciones de los conidios se determinaron utilizando una cámara de Neubauer. Las suspensiones preparadas fueron ajustadas a las concentraciones requeridas en cada bioensayo con Tween 80 con una concentración de 0,01% (v / v). La viabilidad de los conidios (porcentaje de germinación) se evaluó como se describió en la página 164.

Los bioensayos realizados con conidios que no provenían de los hongos aislados de cucarachas y se encontraban preservados en la colección del CEPAVE, fueron re-aislados a partir de larvas infectadas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) infectadas (Fig. 2). La viabilidad de los conidios usados en los tratamientos fue estimada y los conidios utilizados en cada experimento mostraron más del 95% de viabilidad.

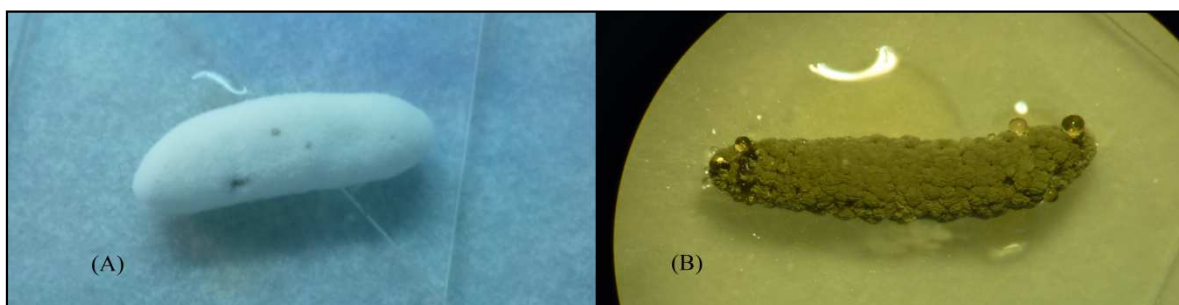


Figura 2. Larvas de *T. molitor* infectadas con (A) *B. bassiana* y (B) con *M. anisopliae*.Evaluación de la patogenicidad de *M. anisopliae* aislados de cucarachas.

Se evaluó la patogenicidad de las cepas de *M. anisopliae* aisladas de cucarachas silvestres. Se probó sobre ninfas de *B. germanica*, por medio de aplicación tópica. El cultivo del hongo y la preparación del inóculo fúngico se realizaron siguiendo el procedimiento explicado en la página 168. Para este experimento, las cucarachas fueron anestesiadas con dióxido de carbono durante 10 segundos y cada insecto fue inoculado con 6 µl de una suspensión de conidios en la región abdominal ventral, entre las coxas del tercer par de patas, utilizando una micropipeta semiautomática (Eppendorf). La dosis de conidios administrada a los insectos se basaron en los resultados de un experimento preliminar. Se aplicó una dosis de 6×10^5 conidios/insecto (1×10^8 conidios/ml).

Los controles fueron tratados con 6 µl de Tween 80 0,01% (v/v). Una vez aplicado el inóculo, las cucarachas fueron colocadas dentro de un recipiente plástico transparente de 250 cm³ con tapa con pequeños orificios circulares conteniendo alimento, que fue cambiado cada dos días y agua *ad libitum*. Los insectos se mantuvieron en incubadora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ HR, y un fotoperíodo de 12:12 luz/oscuridad. La mortalidad fue controlada diariamente durante 20 días. Cada ensayo se repitió tres veces en diferentes fechas y se realizaron dos réplicas de 10 ninfas III por tratamiento. Para cada tratamiento se calculó el porcentaje de mortalidad obtenido a los 20 días posteriores a la inoculación, como así también, se estimó el tiempo letal 50 (TL₅₀).

Las cucarachas muertas fueron removidas diariamente y colocadas sobre un portaobjetos limpio dentro de una cámara húmeda. La cámara húmeda consistió en una caja de Petri (diámetro: 100 mm) esterilizada con dos portaobjetos ubicados perpendicularmente y debajo papel de filtro humedecido con agua destilada estéril. Antes de ser colocados en las cámaras húmedas, los insectos fueron esterilizados superficialmente con etanol 70%, seguido por un baño de agua destilada estéril, un tercer baño de antibióticos (Cloranfenicol y Gentamicina) (ver Anexo) y por último nuevamente por agua destilada estéril. Los cadáveres fueron colocados en cámaras

húmedas, sellados con Parafilm® e incubados a 25 ± 1 ° C y $70 \pm 5\%$ HR. Una vez que el hongo se desarrolló sobre las cucarachas se realizaron aislamientos directos a partir de conidios adheridos a la cutícula del insecto, bajo microscopio binocular estereoscópico y con una aguja esterilizada por flameado y sumergida en Tween 80, 0,01 % se obtuvieron los conidios externos adheridos al tegumento de las cucarachas. Los conidios se inocularon en cápsulas de Petri de 60 mm de diámetro conteniendo medio de cultivo SDYA a 25 °C en oscuridad durante 8 días. A partir de cultivos fúngicos esporulados se realizaron preparados microscópicos semipermanentes en medio de montaje y coloración azul de algodón-Lactofenol de Ammann (0,001 % p/v) (ver Anexo) para visualizar la forma y dimensiones de los conidios, células conidiógenas (fiálides) e hifas y se utilizaron claves taxonómicas específicas para identificar y corroborar las especies de hongos entomopatógenos causantes de la infección.

Los insectos infectados por los hongos entomopatógenos se preservaron en tubos de microcentrífuga tipo Eppendorff conteniendo silica gel, algodón y papel de filtro.

Evaluación de la patogenicidad de las cepas de hongos entomopatógenos aisladas de otros insectos, sobre cucarachas

Fue evaluada la patogenicidad de dos aislamientos de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Isaria fumosorosea* y uno de *Nomuraea rileyi* (Tabla 1), contra adultos y ninfas III de *B. germanica*, esta cucaracha fue tomada como modelo de trabajo ya que es considerada la plaga más importante de estos insectos. A partir de estos cultivos, los conidios fueron cosechados y aplicados con un pincel de pelo de marta (previamente esterilizado en autoclave). Los insectos fueron anestesiados e inoculados en grupos de 10 dentro de un recipiente plástico transparente de 250 cm³. Para cada especie fúngica se realizaron 3 réplicas, de 10 insectos cada una, más un control al que no se le aplicaron conidios del hongo. La mortalidad fue controlada diariamente durante 20 días. De estas cepas se seleccionaron las más patogénicas: *Metarhizium anisopliae sensu lato* (Metsch.) Sorokin CEP 085 y el aislamiento de *B. bassiana* (Bals.- Criv.) Vuill.CEP 077.

Los aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, seleccionados en el paso anterior, fueron evaluados por contacto directo hacia ninfas y adultos de *B. germanica*. Para definir la agresividad de cada cepa se utilizó el tiempo letal medio (TL₅₀). Cada tratamiento consistió en cajas de Petri esterilizadas (diámetro: 10 cm) que contenían en su interior un papel de filtro tratado con 1 ml de una suspensión de 1×10^9 conidios/ ml de *M. anisopliae* o *B. bassiana*. La suspensión de conidios fue ajustada a 1×10^9 conidio/ml tomando como base los resultados de los experimentos preliminares. Los controles fueron tratados con papeles de filtro humedecidos con 1 ml de Tween 80, 0,01% (v/v). Una vez aplicado el inóculo, las cucarachas fueron expuestas durante 24 horas en las cajas de Petri. Luego fueron colocadas dentro de un recipiente plástico transparente de 250 cm³ con tapa con pequeños orificios circulares conteniendo alimento, que fue cambiado cada dos días y agua *ad libitum*. Los insectos se mantuvieron en incubadora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ HR, y un fotoperíodo de 12:12 luz/oscuridad. La mortalidad fue controlada diariamente durante veinte días. En cada tratamiento, se expusieron grupos de 10 adultos y 10 ninfas de tercer estadio y cada ensayo se repitió tres veces en diferentes fechas.

Las cucarachas muertas fueron removidas diariamente colocadas sobre un portaobjeto limpio dentro de una cámara húmeda, siguiendo el procedimiento explicado en la página 169.

Tabla 1. Lista de aislamientos fúngicos utilizados en los ensayos y sus números de referencia en las distintas colecciones micológicas.

Especie fúngica	Hospedador/sustrato	Sitio y fecha de muestreo	Nro. CEPAVE	Nro. ARSEF
<i>L. lecanii</i>	<i>D. kuscheli</i> (Hemiptera. Delphacidae)	Invernáculo, CEPAVE, La Plata 26/08/2003	063	7781
<i>L. lecanii</i>	<i>Myzus persicae</i> (Hemiptera:Aphididae)	Colonia de laboratorio, 29/12/2004	182	7782
<i>I. fumosorosea</i>	Avispa (Hymenoptera)	-	049	-
<i>I. fumosorosea</i>	<i>T. vaporariorum</i> (Hemiptera:Aleyrodidae)	Colonia Urquiza, La Plata. 22/05/2007	315	8730

<i>N. rileyi</i>	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae).	Chivilcoy, Buenos Aires. 09/04/ 2001	022	7480
<i>B. bassiana</i>	Muestras de suelo	Santa Inés, Misiones. 01/11/2008	344	-
<i>B. bassiana</i>	<i>Balacha melanocephala</i> (Hemiptera:Cicadellidae)	Los Hornos, 24/02/04	077	7467
<i>M. anisopliae</i>	Muestras de suelo	Campo, Misiones 14/05/2010	350	-
<i>M. anisopliae</i>	<i>Kanaima fluvialis</i> (Hemiptera: Cercopidae)	Los Hornos 30/03/04	085	-

Efecto del cebo formulado con *M. anisopliae* sobre ninfas y adultos de *B. germanica*.

Los cebos se prepararon con 6 g de comida seca para perros triturada (Purina Dog Chow®, Nestlé Argentina SA, Buenos Aires) en 100 ml de agar-agua al 0,5%. Un ml de una suspensión de 1×10^9 conidios/ml se añadió a 4 ml del cebo, y cuatro mililitros de esta mezcla fue aplicada en placas de Petri (diámetro: 3,5 cm) esterilizadas. El tratamiento control consistió en usar los cebos sin aplicar la suspensión fúngica. Los grupos de 10 adultos y de 10 ninfas del tercer estadio de la cucaracha alemana se expusieron a estos cebos durante 72 hs. Luego fueron colocadas dentro de un recipiente de 250 cm³ con alimento y agua, que fueron renovados cada dos días. Los insectos se mantuvieron en incubadora a 25 ± 1 °C, 70 ± 5 % HR y un fotoperíodo de 12:12 luz /oscuridad. La mortalidad fue controlada diariamente durante veinte días. Cada ensayo se repitió tres veces en diferentes tiempos. Las cucarachas muertas fueron removidas diariamente y colocadas en cámaras húmedas estériles, siguiendo el procedimiento explicado en la página 169.

Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) y del tiempo letal medio (TL₅₀) de *M. anisopliae* sobre cuatro especies de cucarachas.

En esta etapa, fue evaluada la virulencia de *M. anisopliae* CEP 085 por ser el aislamiento que presentó mayor agresividad en los ensayos de laboratorio. Este aislamiento se probó sobre ninfas y adultos de *B. germanica*, *B. orientalis*, *B. dubia* y ninfas de *P. americana* por medio de aplicación tópica. El cultivo del hongo y la preparación del inóculo fúngico se realizaron siguiendo el procedimiento explicado en la página 168.

Para este experimento, las dosis de conidios fueron ajustadas según el peso de las ninfas de tercer estadio y de los adultos. Para esto, 20 individuos de cada especie fueron pesados y promediados. El peso de los adultos y las ninfas tuvieron un rango entre: 67,4 mg – 16,5 mg para *B. germanica*; 329 mg – 52,6 mg para *B. orientalis*; 2267 mg - 65 mg para *B. dubia* y 56 mg para ninfas de *P. americana*. Las cucarachas (ninfas y adultos) fueron anestesiadas con dióxido de carbono durante 10 segundos y cada insecto fue inoculado con 6 µl de una suspensión de conidios en la región abdominal ventral, entre las coxas del tercer par de patas, utilizando una micropipeta semiautomática (Eppendorf). Las dosis de conidios administradas a los insectos se basaron en los resultados de un experimento preliminar. Se aplicaron 4 suspensiones de *M. anisopliae* CEP 085 con dosis finales de 6×10^3 , 6×10^4 , 6×10^5 y 6×10^6 conidios/cucaracha. Sin embargo, debido a la gran diferencia en los pesos entre las especies de cucarachas y los resultados obtenidos de los ensayos preliminares, cada adulto de *B. dubia* y *B. orientalis* fueron inoculados con 150 µl de una suspensión de conidios cuyas dosis finales fueron: 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 y 2×10^7 conidios/cucaracha (Tabla 2). Cada suspensión fue pasada por vórtex durante 30 segundos para lograr una suspensión homogénea al momento de aplicarlas a los insectos. Los controles fueron tratados con 6 µl o 150 µl de Tween 80, 0,01% (v/v) según la especie y estado de desarrollo. Después de la inoculación, los insectos fueron transferidos a vasos de plástico transparentes de 250 cm³ con tapa con pequeños orificios circulares conteniendo alimento y agua, e incubados a 25 ± 1 °C y $70 \pm 5\%$ HR y un fotoperíodo de 12:12 luz/oscuridad. Durante el ensayo el alimento y el agua fueron cambiados cada dos días. Se realizaron tres repeticiones en diferentes tiempos con 10 ninfas y 10 adultos por tratamiento. La mortalidad fue monitoreada diariamente y al cabo de 20 días se determinó el porcentaje de mortalidad promedio para cada dosis, el TL₅₀, la DL₅₀ y DL₉₀.

Las cucarachas muertas fueron removidas diariamente y colocadas en cámaras húmedas siguiendo el procedimiento explicado en la página 169.

Tabla 2. Tratamiento por aplicación tópica de ninfas y adultos de cuatro especies de cucarachas con el hongo *M. anisopliae* CEP 085.

Tratamientos	Dosis ⁽¹⁾	Dosis ⁽²⁾	Concentración
	conidios/cucaracha	conidios/cucaracha	conidios/ml
(C)	0	0	0
(1)	6×10^3	2×10^4	10^6
(2)	6×10^4	2×10^5	10^7
(3)	6×10^5	2×10^6	10^8
(4)	6×10^6	2×10^7	10^9

⁽¹⁾ Dosis aplicadas a ninfas y adultos de *B. germanica*, ninfas de *B. orientalis*, *B. dubia* y *P. americana*; ⁽²⁾ dosis aplicadas a adultos de *B. orientalis* y *B. dubia*. (C) control.

Análisis estadístico

Para determinar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos se realizó un test de ANOVA. Se realizó la transformación angular de los datos, utilizando el arco coseno de la raíz cuadrada del porcentaje de mortalidad antes del análisis, para estabilizar el error de la varianza (Zar 1996). Se realizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$) cuando aparecieron diferencias significativas entre los tratamientos. Los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete Statgraphics Centurion programa 15.2 (StatPoint, Inc., 2007). Los valores de tiempo letal medio (TL_{50}) se calcularon con sus respectivos límites de confianza del 95% (LC) utilizando el software estadístico para datos correlacionados desarrollados por Throne *et al.* (1995) y software Mathematica 5.2 (Wolfram). Se realizaron los análisis utilizando la versión 1.5 Probit Estadístico Software (USEPA) para determinar la curva de dosis-respuesta y para estimar la dosis letal media (DL_{50}) para los tratamientos y sus respectivos límites de confianza del 95% (LC). Las diferencias entre los valores fueron considerados significativos ($p < 0.05$) si los límites de confianza LC 95% no se superponen.

Inyección de blastosporas de *M. anisopliae* a ninfas de *P. americana*

Para los bioensayos se usaron ninfas IV de *P. americana*. Para la producción de blastosporas se usaron cultivos monospóricos del hongo *M. anisopliae* s.l. IP 46, que fue aislado en 2001 de suelo. *M. anisopliae* IP 46 es un hongo que se ha probado por aplicación tópica sobre ninfas I y adultos de *P. americana* resultando muy patogénico (Hubner-Campos *et al.*, 2013). El hongo fue cultivado en medio Agar-papa-glucosa (APG) (ver Anexo) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y 12 h de fotofase. A partir de cultivos de 7 días, los conidios fueron raspados con un ansa de vidrio (Drigalsky), y suspendidos en 5 ml de Tween 80 al 0,01% (v/v) en un tubo de plástico estéril de 45 cm³. La suspensión fue pasada por vortex durante 3 minutos, filtrada a través de un algodón hidrofílico, y luego cuantificada con una cámara de Neubauer. La viabilidad de los conidios usados en los tratamientos fue chequeada como se explica en la página 164.

Para la producción de blastosporas fue utilizado el medio líquido de maíz Adamek's modificado (MMA) (ver Anexo) (Fig. 3). El medio líquido contenido en un Erlenmeyer de 250 ml fue inoculado con una concentración final de 10^4 conidios/ml e incubado en un agitador automático a 100 G durante 4 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Las blastosporas fueron recolectadas por medio de filtración usando una tela de muselina estéril, para remover el micelio. La suspensión resultante fue centrifugada a 9.000 G por 20 min. El pellet con las blastosporas fue re-suspendido en 20 ml de agua destilada estéril, y centrifugado tres veces a 9.000 G por 20 min para remover los remanentes del medio líquido. Finalmente las blastosporas fueron re-suspendidas en solución salina estéril (0,85 % NaCl) (Fig. 3). Las concentraciones de blastosporas se determinaron usando una cámara de Neubauer, y fueron ajustadas, según pruebas preliminares, a 10^7 , 3×10^6 , 10^6 , 3×10^5 y 10^5 blastosporas/ml de solución salina al 0,85%. El porcentaje de blastosporas viables se determinó como se detalla en la página 164.

Para realizar el procedimiento de la inyección intrahemocélica, las ninfas se inmovilizaron a 4°C durante 20 minutos. Cada insecto fue inyectado vía intrahemocélica con 20 μl de una suspensión de blastosporas en la región dorso-lateral dentro del hemocele del primer segmento abdominal con dirección a la parte anterior, utilizando una aguja de 30G de grosor en una jeringa descartable para insulina de 1ml^{-1} (Fig. 4). Las dosis finales utilizadas fueron 2×10^5 , 6×10^4 , 2×10^4 , 6×10^3 y 2×10^3 blastosporas/ninfa. Los controles fueron inyectados con 20 μl de solución salina estéril

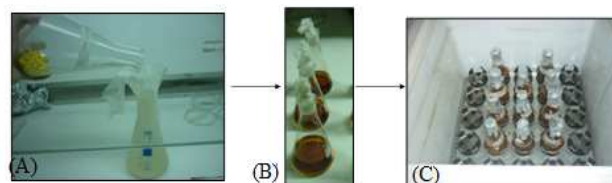
al 0,85%. Después de la inyección los insectos fueron transferidos a cajas de Petri (20 cm de diámetro) conteniendo agua y alimento. Después de 24 horas fueron tomadas las primeras muestras de hemolinfa, este procedimiento se repitió diariamente durante 10 días. Un total de 10 ninfas (4^{to} estadio) se inyectaron por dosis, y se realizaron dos réplicas por dosis. Cada tratamiento se repitió cuatro veces en diferentes fechas.

Las muestras de hemolinfa procedentes de individuos vivos tratados por inyección se obtuvieron de la siguiente manera: cada insecto fue esterilizado superficialmente por inmersión en etanol al 70% durante 3 segundos y posteriormente, dos baños en agua destilada estéril por otros 3 segundos. Para este procedimiento a cada ninfa se le cortó la tercera pata, en la base, con una tijera fina de microdisección, y fueron recogidos 20 µl de hemolinfa con una micropipeta (Fig. 5). Fueron transferidos 10µl de la hemolinfa, obtenidos en el paso anterior, a un tubo Eppendorft con 190 µl de solución salina estéril, mezclados y pasados por vórtex durante 10 segundos. De este modo se determinó el número de blastosporas/µl de hemolinfa con una cámara de Neubauer durante los 10 días que duro el ensayo (Fig. 5). Para el otro test, se determinó el número unidades formadoras de colonias (UFC)/ µl de hemolinfa y los 10 µl de hemolinfa restantes fueron diluidos 10 veces con solución salina estéril al 0,85% y extendidos en una caja de Petri (60 mm de diámetro) con medio Sabouraud Dextrosa Agar suplementado con 0,2 % de extracto de levadura (SDYA) más cloranfenicol (0.5 g/l). Fue evaluado el desarrollo y el número de UFC en el medio de cultivo hasta un máximo de 72 hs de incubación a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $75 \pm 10 \text{ HR}$, y 12 h fotofase (Fig. 5).

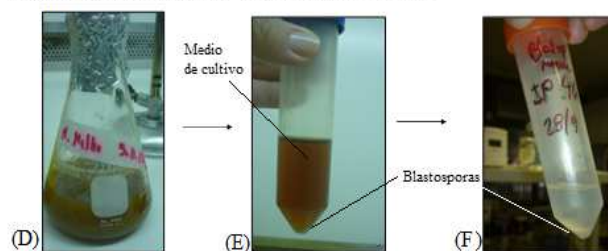
Las ninfas muertas fueron transferidas a una cámara húmeda que consistió en una caja de Petri (100 mm de diámetro) conteniendo papel de filtro estéril e incubadas a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ para permitir el desarrollo de los hongos presentes en los insectos. Los insectos infectados con evidencia de crecimiento fúngico externo fueron examinados bajo microscopio binocular estereoscópico, y las preparaciones microscópicas fueron examinadas bajo un microscopio óptico (40-80x) para confirmar la especie fúngica.

Análisis estadísticos: para detectar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos (blastosporas/µl de hemolinfa y UFC/µl hemolinfa), fue realizado un análisis de la varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$) cuando aparecieron diferencias significativas entre los tratamientos. Los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete Statgraphics Centurion programa 15.2 (StatPoint, Inc., 2007).

(A), (B) y (C): Producción de medio líquido de maíz Adamek's modificado



(D) Medio con Blastoporas (E) Blastoporas filtradas



(F) blastoporas centrifugadas y resuspendidas en solución salina (0,85%)

Figura 3. Producción de blastoporas en medio líquido de maíz Adamek's modificado.



Figura 4. Inyección de ninfas de *P. americana* con blastoporas del hongo *M. anisopliae*.

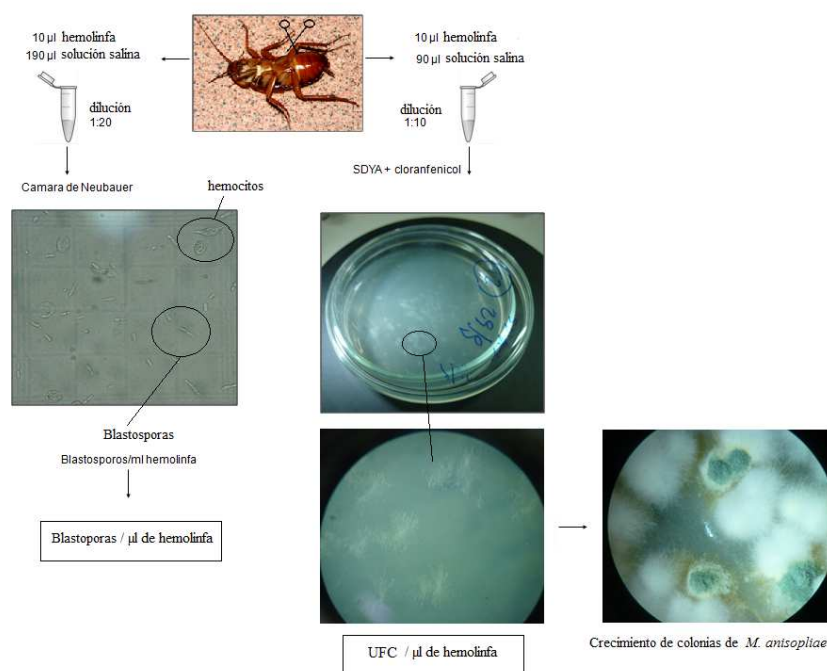


Figura 5. Procedimiento de extracción de hemolinfa para determinar blastosporas/µl de hemolinfa y UFC/ µl de hemolinfa en ninfas de *P. americana*.

Pruebas preliminares para la producción masiva de hongos entomopatógenos y su uso en cebos para control de cucarachas

Preparación del sustrato

Se pesaron 100 gr de arroz parbolizado y se colocó en una bolsa de polipropileno siendo esterilizado en autoclave a 120° y 1 atmósfera de presión por 20 minutos. Al día siguiente se colocaron las bolsas con el arroz a baño de maría, dentro de cada bolsa se colocaron 100 ml de agua destilada, se dejó hervir hasta que se evaporó toda el agua y se cocinó el arroz. Se dejó secar en estufa a 60 °C media hora para que se evaporen restos de agua. A las 24 horas se esterilizó una segunda vez en autoclave, colocándole una segunda bolsa de polipropileno. 24 horas después se secaron las bolsas abiertas bajo cámara de flujo laminar con la luz UV encendida, durante 2 horas.

Preparación de medio líquido para inocular el arroz:

Los dos aislamientos que produjeron mayor mortalidad fueron utilizados para inocular en medio líquido. Las Especies fúngicas utilizadas: fueron *B. bassiana* CEP077

y *M. anisopliae* CEP 085. Se realizaron preparados para corroborar que los cultivos fueran axénicos. Los cultivos se cortaron en cuadrados de 1 cm² bajo cámara de flujo laminar y se colocaron dentro de un Erlenmeyer con 100 ml de medio líquido SDYA 1 %. Se colocaron en un agitador rotatorio a 75 G a temperatura ambiente. El medio inoculado se mantuvo en agitación durante 7 días. En la cámara de flujo laminar se realizó el filtrado colocando un filtro estéril sobre un Erlenmeyer estéril formando un embudo y lentamente se hizo pasar el medio con el inóculo fúngico. En el embudo quedó retenido el micelio y las esporas fúngicas que se dejaron secar en cámara de flujo laminar durante 3 minutos sobre papel de filtro. Este procedimiento se repitió para cada especie fúngica utilizada. El filtrado obtenido se dividió en 3 partes y se inocularon las bolsas de arroz, rotulándolas con la fecha y especie. El ensayo fue realizado 3 veces consecutivas y se incubaron durante 14 y 20 días. Una vez transcurrido el período de incubación, en cada sustrato se determinó el rendimiento de conidios por gramo de sustrato, y el porcentaje de germinación de los conidios.

Evaluación del rendimiento de los conidios

A partir de cada una de las bolsas incubadas durante 14 y 20 días, se tomó un gramo de sustrato y se colocó dentro de un tubo de centrifuga tipo “falcon”, en el cual se adicionó 10 ml de Tween 80 0,01 %. La mezcla fue agitada vigorosamente en un agitador para obtener una suspensión homogénea de conidios. Se realizaron diluciones seriadas a partir de la suspensión madre y las diluciones 1/100 y 1/1000 fueron analizadas en hemocitómetro (cámara de Neubauer) para cuantificar el número de conidios por ml de la dilución. Este valor fue utilizado para estimar el rendimiento expresado como cantidad de conidios por gramo de sustrato.

Evaluación de la viabilidad de los conidios

A partir de cada una de las bolsas de polipropileno que contenían, el arroz inoculado, se tomó un gramo de cada sustrato y se realizó una dilución con Tween 80 (0,01% v/v) hasta ajustar la concentración a 1×10^4 conidios/ml. Luego, 100 µl de las diluciones fueron inoculados sobre una capa delgada de SDYA ubicada en un portaobjeto estéril dentro de una cámara de viabilidad (página 166). Por cada sustrato se prepararon 3 cámaras de viabilidad con el fin de generar replicas. Todas las cámaras fueron incubadas a 25° C en condiciones de oscuridad por 24 hs. Una vez transcurrido el

período de tiempo, se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados mediante la observación en un microscopio con contraste de fases (Olympus Bx41). El porcentaje de germinación promedio se estimó al cuantificar 600 conidios por cápsula y en tres replicas.

Se alimentaron 10 ninfas y 10 adultos de *B. germanica* con el arroz inoculado con los hongos. Se realizaron 3 repeticiones en diferentes fechas.

Estimación de la composición de los ácidos grasos cuticulares de cinco especies de cucarachas por cromatografía gaseosa

Los resultados obtenidos de los bioensayos con hongos entomopatógenos mostraron que la susceptibilidad a *M. anisopliae* tiene relación con la especie de cucaracha analizada y las etapas de desarrollo del insecto. Por lo mencionado anteriormente se inicio el estudio de la composición cuticular de cucarachas determinando los ácidos grasos cuticulares.

Extracción de lípidos cuticulares: las cucarachas se anestesiaron con dióxido de carbono durante 10 segundos. A continuación se realizó la disección de la cutícula de los insectos bajo un microscopio binocular estereoscópico (Zeiss Stemi DV4) con 0,9% de solución salina. Cinco ninfas de tercer estadio y cinco hembras adultas de cada especie de cucaracha se utilizaron para determinar los ácidos grasos de la cutícula. Los restos de cuerpo graso adheridos a las cutículas se removieron con un algodón embebido en solución salina estéril que luego fue descartado, de esta manera se eliminaron los restos de cuerpo graso que no eran de nuestro interés en la determinación de los lípidos cuticulares. El procesamiento de las muestras consistió en la extracción total de los lípidos cuticulares usando el procedimiento de Folch (Folch, 1957) usando la mezcla de Folch (cloroformo / metanol 2: 1 v/v) en una proporción de 20: 1 v/v respecto a la masa de la muestra. Se realizó una partición con 20% v/v de agua destilada. La fase metanólica superior fue desechada. La fase clorofórmica remanente fue evaporada a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. El extracto seco obtenido fue luego saponificado utilizando una solución de hidróxido de potasio al 10% en metanol durante 1 hora a 80 °C usando el bloque de calentamiento eléctrico para eliminar los esteroides, pigmentos y otros lípidos insaponificables cuya presencia interfiere con el método de análisis de los ácidos grasos. El material insaponificable se extrajo con éter de petróleo. Los jabones potásicos de los ácidos grasos contenidos en la muestra fueron

posteriormente acidificados utilizando ácido clorhídrico concentrado, proceso que libera los ácidos grasos. Los ácidos grasos libres se trataron con trifluoruro de boro al 10% en metanol, en atmósfera de nitrógeno y utilizando una placa de calentamiento eléctrico durante 30 minutos a 80°C. Este procedimiento transforma los ácidos grasos en sus derivados más volátiles los ésteres metílicos de ácidos grasos, condición necesaria para su posterior análisis por cromatografía gaseosa. Los ésteres metílicos fueron extraídos utilizando éter de petróleo.

Cromatografía gaseosa: La composición en ácidos grasos fue determinada por cromatografía gaseosa utilizando una columna capilar de 50 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0.1 µm de espesor de film (Chrompack CP SIL 88) en un cromatógrafo de gas-líquido Hewlett Packard 6890 equipado con un Detector de Ionización de Flama (FID). Las condiciones de análisis fueron: 1) temperatura inicial: 185 °C durante 3 minutos, 2) Rampa de calentamiento a razón de 3 grados por minuto hasta alcanzar los 230 °C. 3) Mantenimiento de la temperatura de 230 °C durante 25 minutos. El perfil de ácidos grasos de cada una de las muestras se obtuvo por comparación de los tiempos de retención relativos de cada uno de ellos respecto de estándares comerciales (NuCheck prep.). Analizados previamente en la misma columna.

RESULTADOS.

Aislamiento y caracterización de hongos parásitos de cucarachas.

Se observaron pequeños “pelos” discretos de aspecto hialino a levemente blanco ubicados sobre las antenas de las cucarachas en la colonia del CEPAVE. Al observar estos “pelos” bajo un microscopio binocular estereoscópico (Zeiss Stemi DV4) se determinó que correspondían a una infección fúngica. Se identificaron tres especies de hongos Laboulbeniales del género *Herpomyces* parasitando tres especies de cucarachas, *B. germanica*, *Periplaneta fuliginosa*, *P. americana*. Los insectos infectados y los preparados microscópicos permanentes de las especies fúngicas fueron depositados

como material de herbario de referencia en la colección de hongos del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE).

Subórden Herpomycetinae Tavares, 1981

Presentan un desarrollo y estructura particulares, que definen el suborden, la célula carpogonial o célula fértil, crece a partir de una de las células parietales preformadas.

Herpomyces Thaxter, 1902

Generitypus.-*Herpomyces chaetophilus* Thaxter, 1902

Generitypus specimen.- N.d.

Herpomyces ectobiae Thaxter, 1902

Las cucarachas presentaron una infección formada por un talo femenino hialino, con el ápice del peritecio truncado, sin excrecencia en la región apical y sin escudo. Se observó que los peritecios (de 1 a 12 por talo) eran más anchos cerca del tercio basal, después se estrechaban en forma gradual hacia el cuello, largo, estrecho y bien definido; terminando en un ápice truncado e inclinado. Las células que sostienen los peritecios están aplanadas (Fig. 6 a, b, d, e). El talo masculino hialino, el eje primario formado por 4 células superpuestas, y coronado por una proyección negruzca diminuta. La célula suprabasal se proyectó hacia abajo para formar un eje secundario que se extiende a lo largo de la seta de la antena del insecto. El eje secundario estuvo formado por una serie de células dispuestas lateral y oblicuamente, algunas de las cuales producen ramas, divididas en racimos densos, y portadoras de numerosos anteridios alargados (Fig. 6 a, c, f).

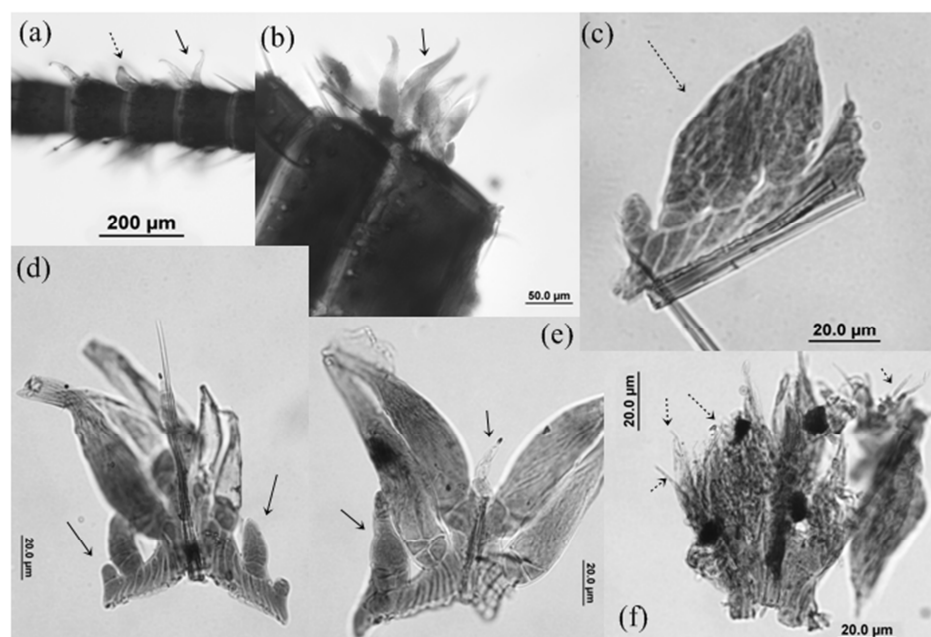


Figura 6. *Herpomyces ectobiae* en antenas de *B. germanica*. (a) las flechas discontinuas marcan el talo masculino y flechas continuas el talo femenino. (b) detalle de la zona de fijación de los talo a la antena. (c) talo masculino en desarrollo. (d-e) las flechas marcan los talos femeninos jóvenes, en el centro se ubican los talos femeninos maduros, adheridos a una seta de la antena. (f) talos masculinos maduros y las ramas con anteridios se marcaron con una flecha discontinua.

Hospedador: sobre machos y hembras adultos de *B. germanica*.

Sitio de infección: los talos estaban unidos a las antenas, y se fijaron entre los artejos, o unidos a las setas de las antenas.

Localidad: La Plata, provincia de Buenos Aires.

Nro de herbario: CEPHe25

***Herpomyces periplanetae* Thaxter, 1902**

El talo femenino se observó enteramente hialino, el eje primario tetracelular. El eje secundario compacto, formador de un escudo bilobado y \pm simétrico, con la zona distal de sección triangular (Fig. 7b), un ápice estrecho y robusto, y la zona basal de contorno circular. Los peritecios se encontraron unidos de 1 a 5, se observaron bastante rectos, asimétricos y fusiformes. Cada peritecio era más ancho cerca del tercio basal, después se estrechaba de forma gradual hacia el cuello, que estaba bien definido e

inclinado, hasta el ostíolo que, a su vez, era lateral, puntiagudo, subagudo, con una excrecencia distal, puntiaguda en forma digitiforme. Los peritecios sostenidos por células aplanadas (Fig. 7 a, c, e, f). El talo masculino hialino, formado por 4 células superpuestas. Las células tercera y cuarta se encontraron sosteniendo unas pocas ramas cortas portadoras de largos anteridios simples (Fig. 7 d).

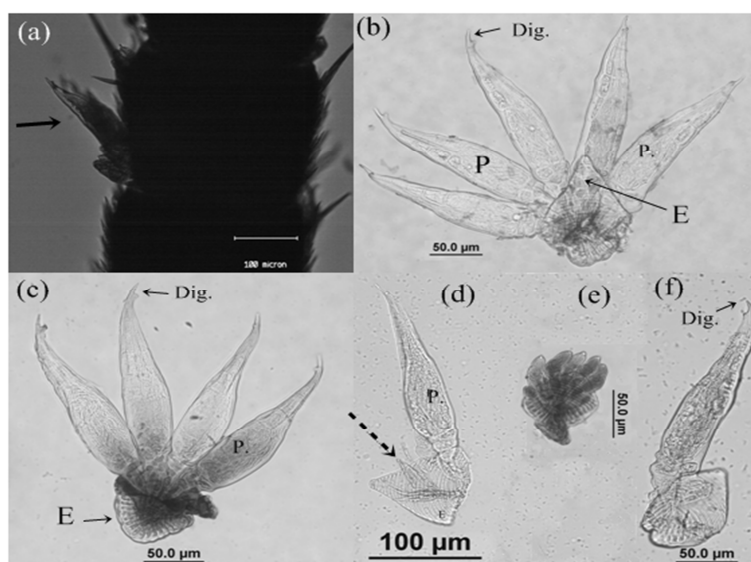


Figura 7. *Herpomyces periplanetae* en antenas de *P. americana*. (a) disposición de los talos en una antena marcados con una flecha continúa. (b) 5 talos femeninos maduros unidos por el escudo de sección triangular distal. (c) 4 talos femeninos maduros unidos por un escudo, con los peritecios maduros. (d) un talo femenino maduro y un talo masculino maduro marcado con una flecha discontinua. (e) Talo femenino en desarrollo. (f) talo femenino con el apéndice distal digitiforme. Dig. : apéndice distal digitiforme; E: escudo; P: peritecio.

Hospedador: sobre machos y hembras adultos de *Periplaneta americana*.

Sitio de infección: los talos estaban unidos a las antenas, y se fijaron entre los artejos, o unidos a las setas de las antenas.

Localidad: La Plata, provincia de Buenos Aires.

Nro de herbario: CEPHe26

Herpomyces stylopygae Spegazzini, 1917

El talo femenino se observó enteramente hialino (Fig. 8 a, b). El eje primario formado por 4 células. Los talos, presentaron un eje secundario compacto, en forma de escudo bilobado y asimétrico, y con la zona distal proyectándose en dos grandes lóbulos también asimétricos; la zona basal se observó levemente ennegrecida (Fig. 8c). Los peritecios se hallaron de 1 a 3 por talo, bastante rectos, asimétricos y fusiformes. Cada peritecio era más ancho cerca del tercio basal, y se fue estrechando de forma gradual hacia el cuello, definido y levemente inclinado. El ostiolo, de ubicación lateral, puntiagudo y subagudo; terminando en una excrecencia distal puntiaguda, en forma digitiforme (Fig. 8 d, f). Los peritecios sostenidos por células aplanadas (Fig. 8e). El talo masculino se observó enteramente hialino, formado por 4 células superpuestas. Las células tercera y cuarta sostienen unas pocas ramas cortas portadoras de largos anteridios simples.

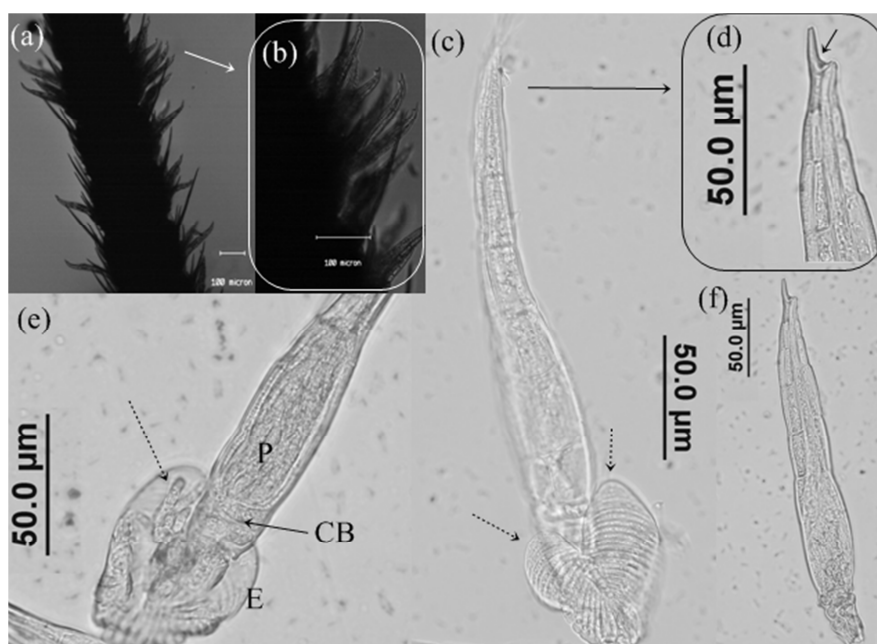


Figura 8. *Herpomyces stylopygae* en antenas de *P. fuliginosa*. (a) disposición de los talos en una antena, la flecha blanca amplía en (b) una zona de infección por *H. stylopygae*, donde se observa una gran cantidad de talos femeninos. (c) talo femenino maduro, las flechas discontinuas marcan los dos lóbulos asimétricos del escudo. (d) detalle del ápice del talo femenino con las proyecciones digitiformes y la flecha marca el ostiolo. (e) la flecha discontinua marca los talos femeninos en desarrollo, CB: células basales aplanadas; P: peritecio maduro; E: escudo. (f) Talo femenino maduro.

Hospedador: sobre machos y hembras adultos de *P. fuliginosa*.

Sitio de infección: los talos estaban unidos a las antenas, y se fijaron entre los artejos, o unidos a las setas de las antenas.

Localidad: La Plata, provincia de Buenos Aires.

Nro de herbario: CEPHe27.

Relevamiento e identificación de hongos patógenos de cucarachas

El relevamiento de especies fúngicas a partir de insectos realizado en la ciudad de La Plata fue negativo. Sin embargo, el relevamiento de cucarachas silvestres realizado en la reserva “El Destino” de Magdalena y en la reserva de “El Palmar” en Entre Ríos fue positivo.

Lugar de muestreo: Reserva Nacional El Palmar, ubicado en el departamento de Colón, en la provincia de Entre Ríos.

Fecha	Insecto recolectado	Insectos infectados	Especie fúngica	Coordenadas geográficas
10/06/2013	Ninfas de Blattodea	1	<i>Metarhizium anisopliae s.l.</i>	Lat.: 31° 51'46.40"S Long.: 58° 13'44.63"O.
11/06/2013	Ninfas de Blattodea	1	<i>Metarhizium anisopliae s.l.</i>	Lat.: 31° 52'31.12"S Long.: 58° 12'48.45"O.

En la reserva de El Palmar de Colón, en Entre Ríos se detectaron dos ninfas de cucarachas silvestres infectadas con un hongo de color verde oliváceo (Fig. 9 b,c), se encontraron sobre un árbol (Fig. 9 a,b), al realizar los preparados microscópicos las características coincidían con la especie *M. anisopliae sensu lato*. Se pudieron recolectar insectos vivos pero no se detectaron los adultos, sin los adultos no es posible identificar a que familia pertenecen las mencionadas ninfas (Fig. 9d).

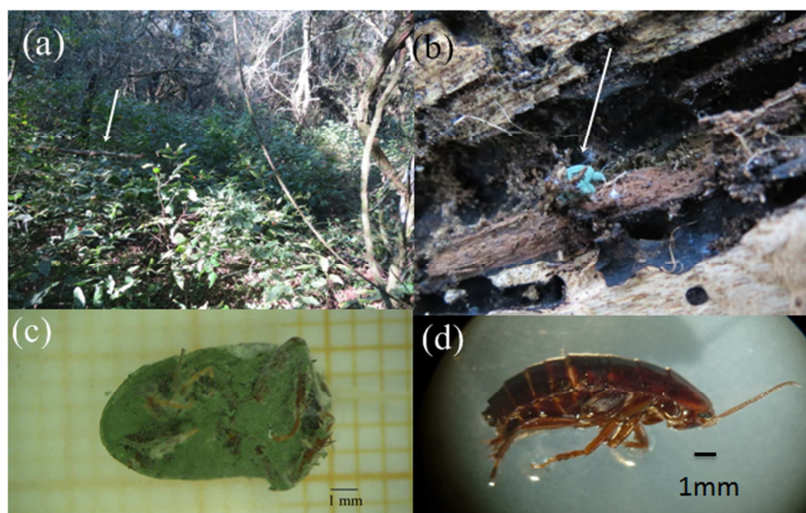


Figura 9. (a) zona donde se recolectó un ejemplar de cucaracha infectada con el hongo. (b) la flecha blanca marca la cucaracha infectada sobre el tronco. (c) ninfa de cucaracha infectada con *M. anisopliae* s.l. (d) ninfa de cucaracha sana.

Lugar de muestreo: Reserva provincial El Destino, ubicada en la localidad de Magdalena, Provincia de Buenos Aires.

Fecha	Insecto recolectado	Insectos infectados	Especie fúngica	Coordenadas geográficas
14/08/2013	<i>Epilampra</i> sp.	2 ninfa	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Lat.: 35° 8'33.07"S Long.: 57° 23'11.51"O.
16/05/2014	<i>Epilampra</i> sp.	6 ninfa	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Lat.: 35° 8'33.07"S Long.: 57° 23'11.51"O.
29/05/2014	<i>Epilampra</i> sp.	8 ninfa	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Lat.: 35° 8'17.64"S Long.: 57° 23'44.43"O.
06/03/2015	<i>Epilampra</i> sp.	1 ninfa	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Lat.: 35° 8'17.64"S Long.: 57° 23'44.43"O.

En la reserva El Destino en Magdalena se detectaron un total de 17 ninfas con infecciones fúngicas, todas asociadas a los Talas, *Celtis tala* (Ulmaceae), que se encontraban en pudrición en el suelo del bosque nativo (Fig. 10a,b,c). Fue posible recolectar ninfas y adultos vivos e identificar que las cucaracha pertenecerían a *Epilampra* sp. (Blaberidae: Epilamprinae) (Fig. 10d). Las infecciones se detectaron solo en ninfas con el desarrollo de un hongo, y el color observado en el hábitat natural malaquita (Fig. 10b), y en el laboratorio el color del hongo se observó verde oliváceo (Fig. 10c), al realizar los preparados microscópicos coincidían con las características de *M.anisopliaes.l.*

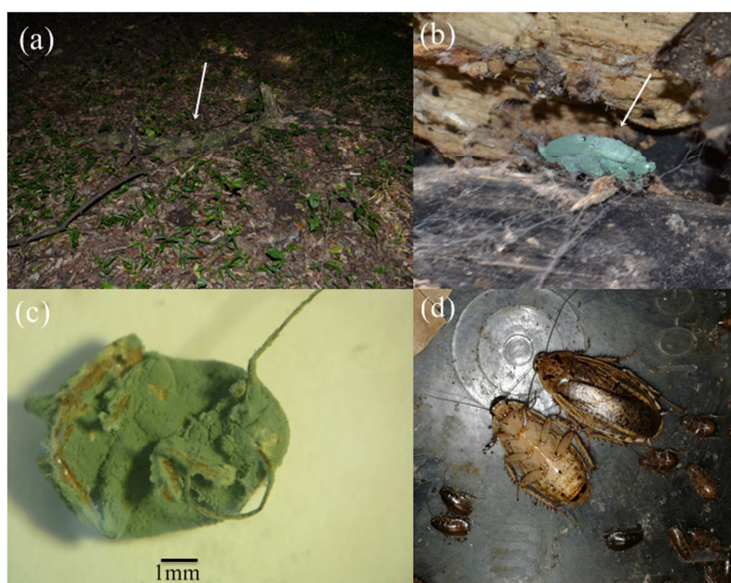


Figura 10. (a) la flecha blanca marca el Tala donde se recolectó un ejemplar de cucaracha infectada. (b) la flecha blanca marca la cucaracha infectada sobre el tronco del Tala. (c) ninfa de cucaracha infectada con *M. anisopliae*. (d) adultos y ninfa de *Epilampra* sp. vivas.

Aislamiento y caracterización de hongos patógenos de cucarachas.

A partir de los insectos recolectados en el campo se lograron obtener 3 aislamientos puros de hongos entomopatógenos. Mediante el aislamiento monospórico de cada una de las especies de hongos muestreadas y así se originaron poblaciones homogéneas de conidios. En la Tabla 3 se presentan los datos de las especies fúngicas,

el hospedador del que fueron aisladas, el sitio y fecha de muestreo, así como sus números de acceso a la colección de hongos entomopatógenos del CEPAVE.

Tabla 3. Lista de aislamientos fúngicos depositados en la colección de micológica del CEPAVE.

Especie fúngica	Hospedador	Sitio y fecha de muestreo	Nro.CEPAVE
<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Blattodea	Reserva El Palmar, Entre Ríos 10/06/2013	414
<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Blattodea	Reserva El Palmar, Entre Ríos 11/06/2013	415
<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	<i>Epilampra</i> sp.	Reserva El Destino, Buenos Aires 14/08/2013	424

Caracterización morfológica de hongos entomopatógenos

Metarhizium anisopliae *esensu lato* (Metschnikoff) Sorokin

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Las colonias presentaron variados matices de amarillento a verde, predominando el color verde oliváceo, de las masas de esporas, adquiriendo posteriormente un verde más oscuro, dependiendo del aislamiento.

Las colonias presentaron un crecimiento de moderado a moderadamente rápido en medio de cultivo SDYA (Fig. 11), alcanzando un diámetro promedio de $26,7 \pm 3,6$

mm a los 10 días de incubación a 25 °C en oscuridad. El diámetro de la colonia osciló entre $30,7 \pm 0,25$ mm para el aislamiento CEP 414; entre $29,9 \pm 0,71$ mm para el aislamiento CEP 415, y $19,5 \pm 0,18$ para el aislamiento CEP 424. Las diferencias en la tasa de crecimiento fueron altamente significativas entre los aislamientos fúngicos (ANOVA $F=14,83$; $g.l=2$; $p<0,000$) (Tabla 4), observando el valor máximo en el aislamiento CEP 414 ($1,4 \pm 0,03$ mm/día) y el valor mínimo en el aislamiento CEP 424 ($1,1 \pm 0,04$ mm/día), (Tabla 4) (Fig. 12).

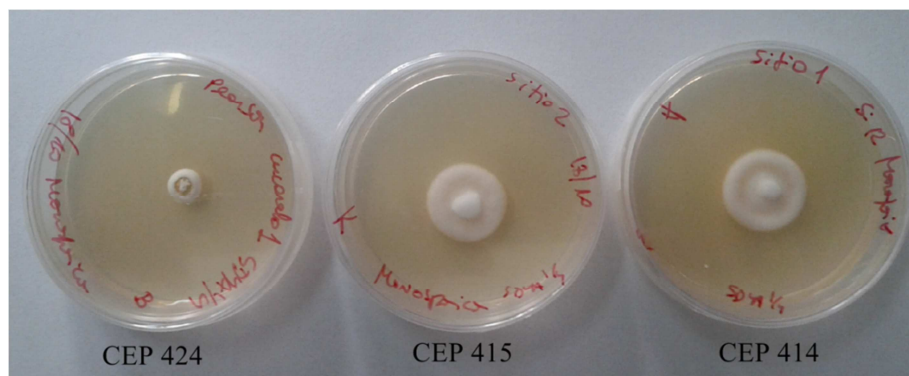


Figura 11. Diferencias de crecimiento radial entre los tres aislamientos de *M. anisopliae* a las 72 horas de inoculación.

Tabla 4. Descripción macroscópica de los aislamientos Fúngicos de *M. anisopliae*

Nº colección CEPAVE	Color de la colonia	Diámetro de la colonia (mm)+	Tasa de crecimiento (mm/día)*
CEP 414	verde oliváceo	$30,7 \pm 0,25$	$1,4 \pm 0,03$ a
CEP 415	verde oliváceo	$29,9 \pm 0,71$	$1,3 \pm 0,04$ a
CEP 424	verde oliváceo	$19,5 \pm 0,18$	$1,1 \pm 0,04$ b

+ Diámetro promedio de la colonia (error estándar) determinado a los 10 días post-inoculación a 25 °C en condiciones de oscuridad. * Tasa de crecimiento promedio (error estándar) determinado como el diámetro de colonia/el tiempo de incubación. Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey $p<0,05$).

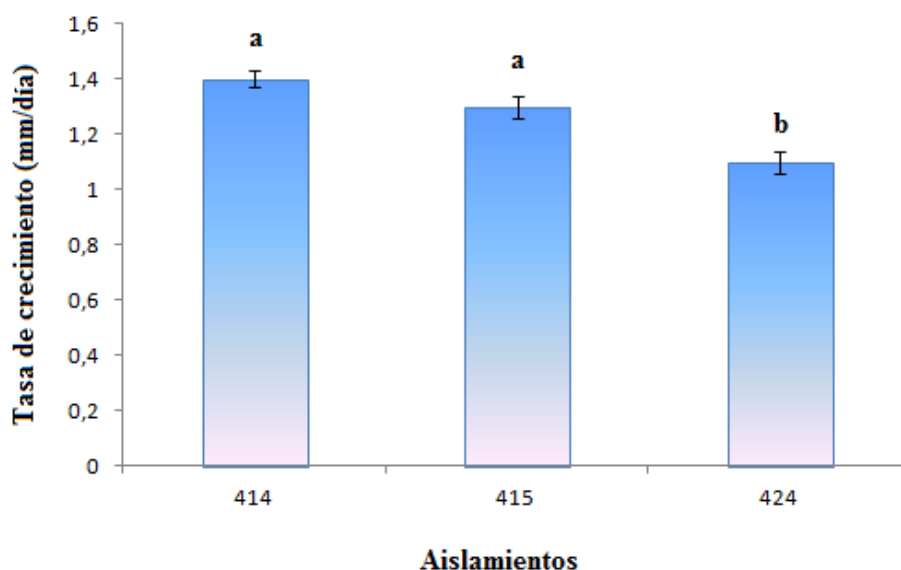


Figura 12. Tasa de crecimiento de los aislamientos de *M. anisopliae* alcanzado a los 10 días desde la inoculación. Las barras indican el porcentaje de mortalidad y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias significativas obtenidas por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Las descripciones morfológicas de las colonias se realizaron teniendo en cuenta el tipo de crecimiento y coloración del micelio fúngico, así como también la presencia o ausencia de gotas de exudado y la pigmentación del medio de cultivo (Fig. 13).

- 1- Colonias de bordes irregulares, micelio blanco, fino y abundante, elevado del medio de cultivo, formando agrupaciones casi esféricas sobre las cuales se observa la esporulación. Esporulación de color verde oliváceo oscuro, y dispuesto en parches. Sin gotas de exudado. Reverso incoloro, con algunas pequeñas zonas de color amarillo pálido (aislamientos CEP 414, CEP 415).
- 2- Colonias de bordes irregulares. Micelio creciendo al ras del medio de cultivo, bien adherido al mismo. La esporulación de color amarillo para luego pasar a verde oliváceo oscuro, los conidios se disponen uniformemente en toda la superficie de la colonia, formando paquetes de conidios (esporodoquios), que se fueron quebrando de forma irregular. Se observaron pequeñas gotitas de exudado incoloras, en mayor cantidad en los márgenes. Reverso amarillo a castaño, más oscuro en el centro de la colonia (aislamiento CEP 424).



Figura 13. Morfología de la colonia de los diferentes aislamientos de *M. anisopliae*.

El hongo presentó hifas lisas, septadas, los conidios presentaron una forma cilíndrica, ahusados y con ambos extremos redondeados, formando cadenas muy largas hialinas a verde oliváceo (Fig. 14).

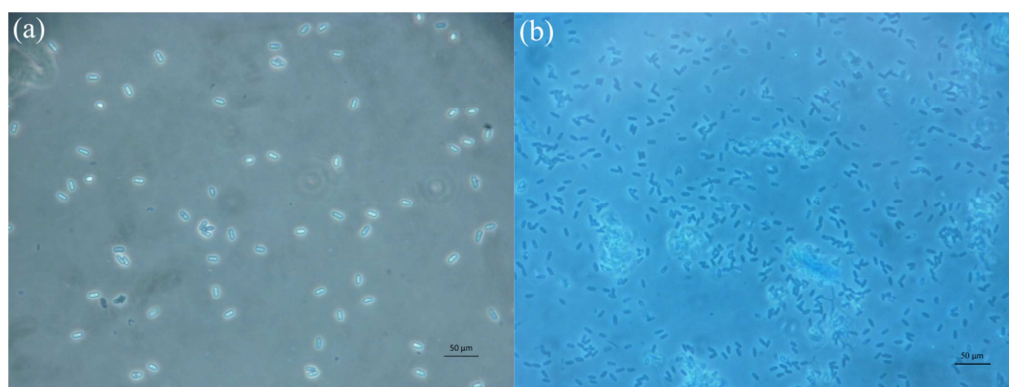


Figura 14. Observación microscópica de los conidios de *M. anisopliae*. A partir de cultivos *in vitro* de *M. anisopliae*, (a) conidios observados con contraste de fases. (b) preparados microscópicos con el colorante azul de algodón-lactofenol de Ammann (0,01 p/v).

Las diferencias en el largo de los conidios entre los tres aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (ANOVA $F = 26,18$; $g.l = 2$; $p = 0,000$), observando el valor máximo en CEP 424 ($7,4 \pm 0,08 \mu m$) y el valor mínimo en CEP 415 ($6,6 \pm 0,07 \mu m$); el tamaño promedio de los conidios fue de $6,9 \pm 0,22 \mu m$. Las diferencias en el ancho de los conidios entre los tres aislamientos fúngicos no fueron significativas (ANOVA $F = 1,61$; $g.l = 2$; $p = 0,206$), el tamaño promedio de los conidios fue de $2,72 \pm$

0,03 μm . Las diferencias en la relación entre el largo y ancho de los conidios entre los tres aislamientos fúngicos no fueron significativas (ANOVA $F=2,18$; $g.l = 2$; $p = 0,119$) (Tabla 5).

La viabilidad de los conidios fue medida como porcentaje de germinación. Las diferencias entre los aislamientos fúngicos fueron altamente significativas (ANOVA $F=335,44$; $g.l = 2$; $p = 0,000$), obteniéndose valores superiores al 90%.

Tabla 5. Descripción microscópica de los aislamientos fúngicos de *M. anisopliae*.

N° Colección CEPAVE	Forma	Conidios			
		Tamaño (μm)+		Germinación(%) ¹	Germinación(%) ²
		Largo	Ancho		
CEP 414	cilíndrico	6,8 \pm 0,07a	2,7 \pm 0,05 a	95,4 \pm 0,06 a	
CEP 415	cilíndrico	6,6 \pm 0,07 a	2,7 \pm 0,05 a	95,0 \pm 0,02 a	
CEP 424	cilíndrico	7,4 \pm 0,08 b	2,8 \pm 0,08 a	0,0 b	92,7 \pm 0,05

+ Mediciones del largo y ancho de los conidios (error estándar) realizadas bajo microscopio con contraste de fase. ¹ Porcentaje de germinación (error estándar) determinado a las 24 hs post-inoculación. ² Porcentaje de germinación (error estándar) determinado a las 48 hs post-inoculación.

Evaluación de la patogenicidad de *M. anisopliae* aislados de cucarachas.

Los 3 aislamientos fúngicos de *M. anisopliae* ocasionaron la infección y muerte de las ninfas de *B. germanica*. Los síntomas de infección fueron observados por la exteriorización del hongo, primeramente, en las zonas intersegmentales del abdomen, tórax, aparato bucal y patas, produciendo conidios de coloración verde. Las primeras cucarachas muertas fueron observadas a los 4 días post-tratamiento. Las diferencias en el porcentaje de mortalidad de las ninfas de *B. germanica* entre el tratamiento control y los 3 aislamientos fúngicos, fueron altamente significativas entre el control y los tratamientos CEP415 y CEP424, el tratamiento CEP 414 no fue significativamente diferente al control (ANOVA $F = 14,68$; $g.l = 3$; $p < 0,001$). Dos de los tres aislamientos de *M. anisopliae* ocasionaron un porcentaje de mortalidad superior al 50%, observando

el valor máximo en CEP 424 (76,7 %) y el valor mínimo en CEP 414 (36,7%) (Tabla 6). Se estimó el tiempo letal medio (TL₅₀) de los 2 aislamientos fúngicos que superaron el 50% de mortalidad en las ninfas de *B. germanica*. Los valores del TL₅₀ oscilaron entre 7,2 días para el aislamiento CEP 424 y 8 días para el aislamiento CEP 415 (Tabla 6).

Los insectos muertos fueron colocados en cámaras húmedas y transcurridos ocho días se observó sobre todo el cuerpo del hospedador el desarrollo de micelio fúngico, adoptando un aspecto de color verde oliva, aproximadamente el 10 % de las cucarachas muertas no esporularon.

Tabla 6. Mortalidad y TL₅₀ de las cepas del hongo *M. anisopliae* aisladas de cucarachas silvestres.

Aislamiento fúngico	Mortalidad (%)*		TL ₅₀ (Días, IC 95 %)+
Control	0	a	
CEP 414	36,7 ± 0,03	ab	
CEP 415	56,7 ± 0,2	bc	8 (6,6-13,8)
CEP 424	76,7 ± 0,1	c	7,2 (6,1-8,6)

* Porcentaje de mortalidad promedio (error estándar) a los 20 días posteriores a la inoculación.

Valores seguidos de letras distintas difieren estadísticamente (Test de Tukey p < 0,05).

+ Tiempo letal medio (TL₅₀) calculado con un programa Probit.

Evaluación de la patogenicidad de las cepas de hongos entomopatógenos, aislados de otros insectos, sobre cucarachas

La mortalidad causada por las diferentes cepas de hongos entomopatógenos aplicadas por pincelada sobre ninfas y adultos de *B. germanica* generaron una mortalidad que varió entre 0 a 100% en adultos y entre 0 y 50% en ninfas (Fig. 15).

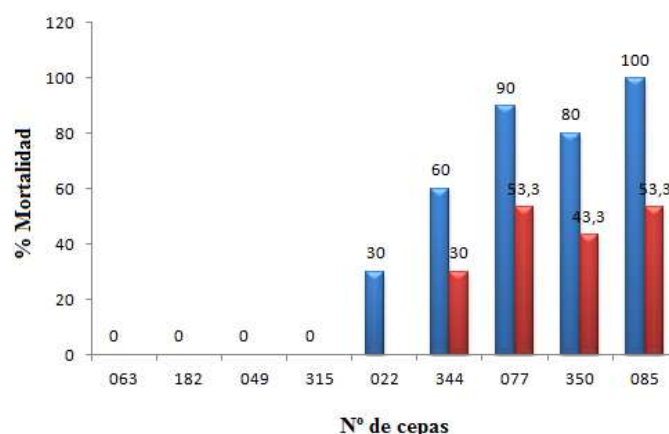


Figura 15. Mortalidad de ninfas (color rojo) y adulto (color azul) de *B. germanica*.

Efecto de los tratamientos de contacto directo y cebo sobre ninfas y adultos de *B. germanica*.

Las primeras cucarachas muertas fueron observadas 5 días post-tratamiento. Los niveles de mortalidad de ninfas de *B. germanica* durante los 20 días que duró el tratamiento por contacto directo con *M. anisopliae*, fue del 60% después de 15 días; mientras que con *B. bassiana* fue del 40% después de 10 días (Fig. 16) y usando cebo con *M. anisopliae* la mortalidad alcanzó el 10% después de 15 días pos tratamiento (Tabla 7). La mortalidad en los controles fue del 0%. La mortalidad debida al tratamiento de contacto directo con *M. anisopliae* o *B. bassiana* fue altamente significativa en ninfas al compararla con el control y el cebo ($F = 33,9$; $df = 3$; $P = 0.0000$) (Tabla 7). El TL_{50} obtenido para ninfas de *B. germanica* tratadas por contacto directo con *M. anisopliae* fue de 8,63 días, con límites entre 3,9 y 27,8 ($1,29 \pm 0,4$) días. El TL_{50} para el resto de los tratamientos no fue calculado, ya que el porcentaje de mortalidad no alcanzó el 50%.

Los niveles de mortalidad para los adultos de *B. germanica* durante los 20 días que duró el ensayo por contacto directo con *M. anisopliae* o *B. bassiana*, alcanzó valores de 93,3 y 80% después de 10 días, respectivamente (Fig. 17). Con el cebo de *M. anisopliae* murieron el 40 % de los adultos después de 20 días posteriores al tratamiento (Tabla 7). La mortalidad debida al tratamiento por contacto directo con *M. anisopliae* o *B. bassiana* fue altamente significativa en adultos comparada con el control, y la mortalidad de adultos de *B. germanica* debida al cebo con *M. anisopliae*

también fue altamente significativa comparada con el control (Tabla 7) ($F = 31,29$; $df = 3$; $P = 0,0000$). Finalmente, el TL_{50} obtenido para los adultos tratados con contacto directo con *M. anisopliae* fue de 3,8 días, con límites entre 2,5 y 5,4 ($2,7 \pm 0,6$) días y el TL_{50} obtenido para adultos tratados por contacto directo con *B. bassiana* fue de 4,9 días, con límites entre 3 y 7,7 ($2,3 \pm 0,5$) días.

En ninfas y adultos de *B. germanica* el cebo fue el tratamiento menos efectivo de los probados con *M. anisopliae*. Cuando se trató a las ninfas por contacto directo, *M. anisopliae* presentó mayor agresividad y generó una mortalidad que superó el 50% en comparación con el tratamiento de *B. bassiana*. En los adultos *M. anisopliae* también fue más agresivo que *B. bassiana*, y en los adultos las diferencias entre tratamientos entre ambos hongos fueron significativas (Tabla 7). El porcentaje de mortalidad en adultos de *B. germanica* fue mayor que en las ninfas cuando se trataron por contacto directo y por cebo, este patrón se repitió con ambos hongos. El tiempo de mortalidad de los adultos fue menor en comparación con las ninfas, es decir, los adultos fueron más susceptibles a los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

Las cucarachas muertas por los hongos cuando fueron colocadas en cámaras húmedas, presentaron crecimiento fúngico que emergió a través de las regiones intersegmentales del cuerpo, inicialmente blanco y, posteriormente verde-oliva en el caso de *M. anisopliae* (Fig. 18), aproximadamente el 10 % de las cucarachas muertas no esporularon.

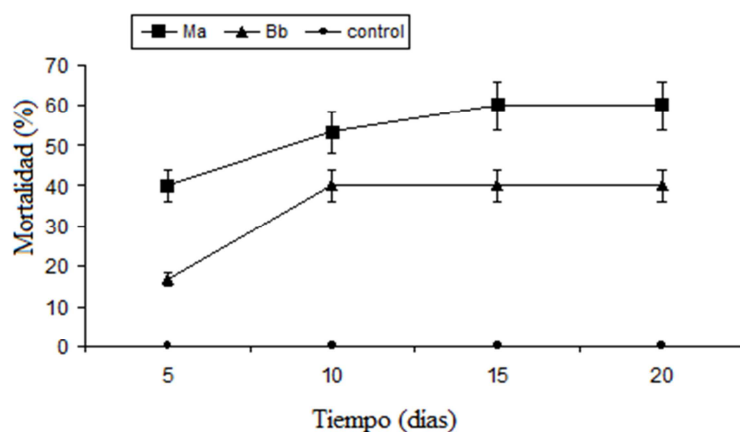


Figura 16. Porcentaje de mortalidad de ninfas de *B. germanica* tratadas por contacto directo con *M. anisopliae* y *B. bassiana*.

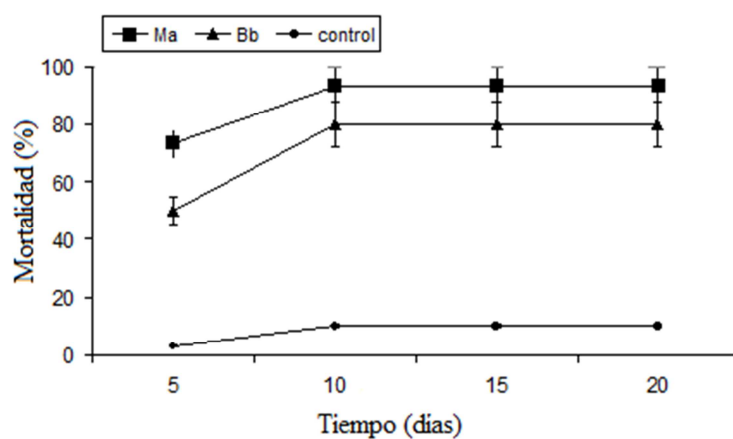


Figura 17. Porcentaje de mortalidad de adultos de *B. germanica* tratadas por contacto directo con *M. anisopliae* y *B. bassiana*

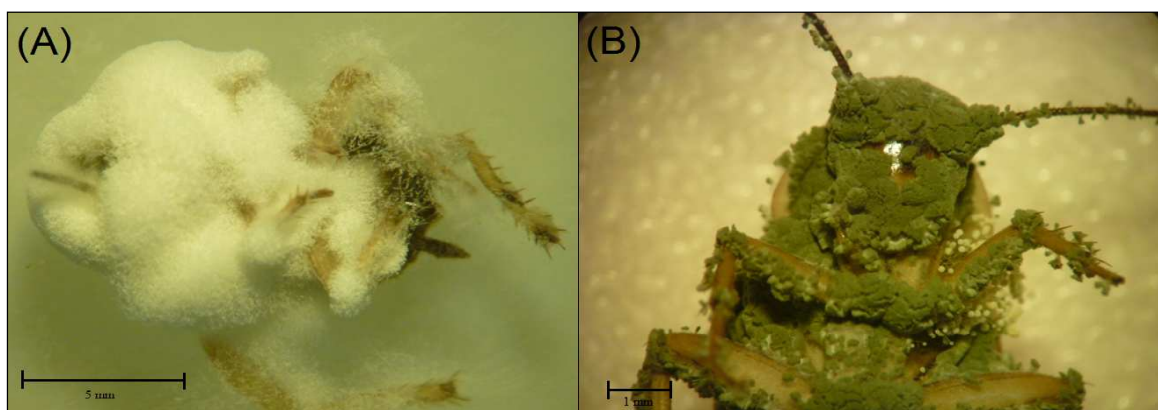


Figura 18. Adultos de *B. germanica* infectados con (A) *B. bassiana* y (B) *M. anisopliae* al ser tratados por contacto directo.

Tabla 7. Mortalidad acumulada (%) de ninfas y adultos de *Blattella germanica* expuestos a contacto directo con *M. anisopliae* (CEP 085) and *B. bassiana* (CEP 077) y cebo con *M. anisopliae*.

Tratamientos	Ninfas					Adultos				
	Días de tratamiento					Días de tratamiento				
Contacto directo	5 días	10 días	15 días	20 días	Sig.	5 días	10 días	15 días	20 días	Sig.
Control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	a	3,30 ± 0,6	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	a
<i>M. anisopliae</i>	40,0 ± 1	53,3 ± 0,6	60 ± 1,0	60 ± 1,0	b	73,3 ± 2,1	93,3 ± 0,6	93,3 ± 0,6	93,3 ± 0,6	c
<i>B. bassiana</i>	16,7 ± 1,2	40,0 ± 1,7	40 ± 1,7	40 ± 1,7	b	50,0 ± 1,0	80,0 ± 1,0	80,0 ± 1,0	80,0 ± 1,0	bc
Cebo	5 días	10 días	15 días	20 días	Sig.	5 días	10 días	15 días	20 días	Sig.
Control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	a	0±0	3,30 ± 0,6	10,0 ± 1	13,3 ± 0,6	a
<i>M. anisopliae</i>	0 ± 0	0 ± 0	10 ± 1	10 ± 1	a	0±0	23,3 ± 2,1	33,3 ± 3	40,0 ± 2,6	b

Para cada tratamiento se expresa la media de la mortalidad (\pm error estándar); **Sig.** las diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas según test de Tukey's ($P < 0.05$).

Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) y del tiempo letal medio (TL₅₀) de *M. anisopliae* sobre ninfas y adultos de cuatro especies de cucarachas.

En las figuras 19 a 24 se muestran los porcentajes de mortalidad de las ninfas y adultos de las cucarachas cuando se trataron por aplicación tópica con cuatro dosis diferentes del hongo *M. anisopliae* CEP 085 más el control (ver referencia de los tratamientos en la Tabla 2).

En la figura 19 se muestran los porcentajes de mortalidad de las ninfas de *B. germanica*. A medida que aumentó la concentración de los conidios se observó un aumento en la mortalidad de las ninfas, observando un máximo de mortalidad (56,7 %) con la dosis 6×10^6 conidios (1×10^9 conidios/ml) y el valor mínimo (3,3 %) con la dosis 6×10^3 conidios (1×10^6 conidios/ml). No se observó mortalidad en los insectos control. El tratamiento con la dosis (4) (6×10^6 conidios/insecto) evidenció diferencias altamente significativas ($F = 6,32$; $gl = 4$; $p = 0,0084$) al compararla con el control y con la dosis (1) (6×10^3 conidios/cucaracha). Las ninfas tuvieron una DL₅₀ de $3,4 \times 10^6$ conidios/cucaracha (Tabla 8). Y TL₅₀ de 10,6 días (Tabla 9).

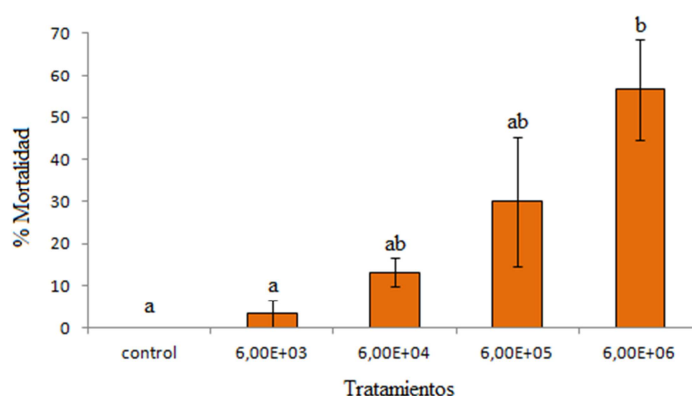


Figura 19. Porcentaje de mortalidad de ninfas de *B. germanica* causados por el hongo *M. anisopliae* obtenidos a los 20 días posteriores a la inoculación por aplicación tópica.

Las barras indican el porcentaje de mortalidad y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias significativas obtenidas por el test de Tukey ($p < 0,05$).

En la figura 20 se muestran los porcentajes de mortalidad de los adultos de *B. germanica*. El aumento en la concentración de los conidios se correspondió con un aumento en la mortalidad de los adultos, observándose la mayor mortalidad (90 %) con la dosis 6×10^6 conidios (1×10^9 conidios/ml) y el valor mínimo (10 %) con la dosis de 6×10^3 conidios (1×10^6 conidios/ml). Se registraron diferencias altamente significativas cuando se compararon las mortalidades causadas por las dosis 3 y 4 con el control. Asimismo diferencias altamente significativas fueron observadas al comparar la mortalidad causada por la dosis 4 con la causada por las dosis 1 y 2 ($F = 12,42$; $gl = 4$; $p = 0,007$). En el control se obtuvo una mortalidad del 3,3 %. La DL_{50} para los adultos fue de $2,7 \times 10^5$ conidios/cucaracha (Tabla 8) y el TL_{50} de 5,6 días (Tabla 9).

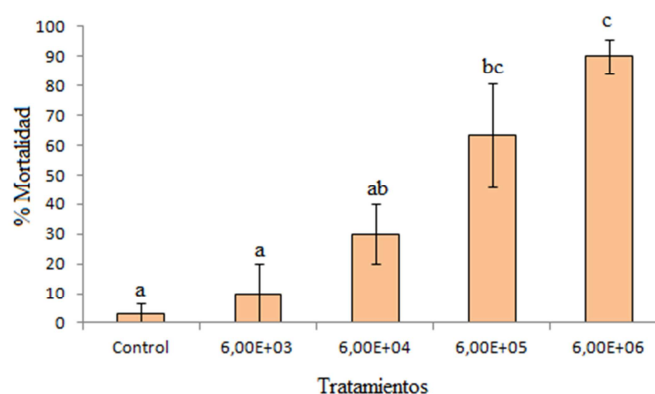


Figura 20. Porcentaje de mortalidad de adultos de *B. germanica* causados por el hongo *M. anisopliae* obtenidos a los 20 días posteriores a la inoculación.

Las barras indican el porcentaje de mortalidad y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias significativas obtenidas por el test de Tukey ($p < 0,05$).

La mortalidad observada en las ninfas y adultos de *B. germanica* debida a *M. anisopliae*, fue mayor en las ninfas. El TL_{50} fue menor para los adultos cuando se comparó con las ninfas, el TL_{50} de los adultos fue significativamente diferente al TL_{50} de las ninfas debido a que sus límites de confianza no se traslapan (Tabla 9). Las ninfas tuvieron una DL_{50} mayor que los adultos, la DL_{50} de las ninfas fue significativamente diferente al DL_{50} de los adultos debido a que sus límites de confianza no se superponen. Es decir, una menor

DL₅₀ indica una mayor susceptibilidad de los adultos de *B. germanica* al aislamiento del hongo *M. anisopliae*, de manera que se requiere una menor concentración de conidios para eliminar el 50 % de los insectos plaga. Además los adultos alcanzaron el 50% de mortalidad en menor tiempo al comparar con las ninfas.

En la figura 21 se muestran los porcentajes de mortalidad de las ninfas de *B. orientalis*. El mayor porcentaje de mortalidad se observó (53,3%) con la dosis (4) de 6×10^6 conidios. En el control se obtuvo una mortalidad del 10%. La mortalidad de las ninfas de *B. orientalis* causada por la dosis (4) se diferenció alta y significativamente cuando se comparó con el control ($F= 5.82$; $gl= 4$; $P= 0.01$). La DL₅₀ obtenida fue de $5,5 \times 10^6$ conidios (Tabla 8) y el TL₅₀ fue de 6,8 días (Tabla 9). Los adultos de *B. orientalis* no fueron susceptibles a la cepa del hongo *M. anisopliae* en ninguna de las repeticiones realizadas.

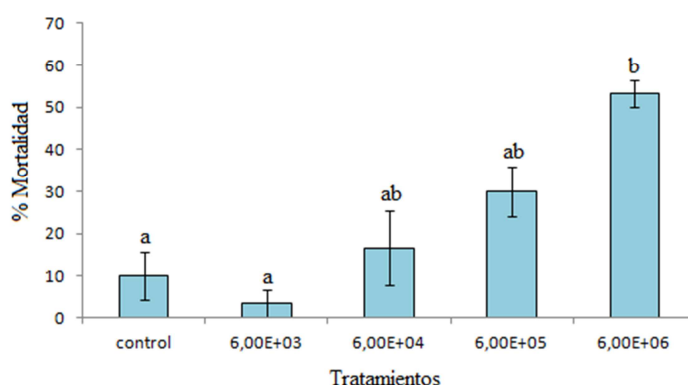


Figura 21. Porcentaje de mortalidad de ninfas de *B. orientalis* causados por el hongo *M. anisopliae* obtenidos a los 20 días posteriores a la inoculación.

Las barras indican el porcentaje de mortalidad y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias significativas obtenidas por el test de Tukey ($p < 0,05$).

En la Figura 22 se muestran los porcentajes de mortalidad de las ninfas de *B. dubia* cuando se trataron por aplicación tópica con el hongo *M. anisopliae* CEP 085. A medida que aumentó la concentración de los conidios se observó un aumento en la mortalidad de las ninfas, observándose un máximo de mortalidad (96,7 %) con la dosis (4) de

6×10^6 conidios y el valor mínimo (3,3 %) con la dosis (1) de 6×10^3 conidios. No se observó mortalidad en los insectos control. El porcentaje de mortalidad causado por las dosis (2), (3) y (4) se diferenció alta y significativamente al ser comparado con el porcentaje de mortalidad causado por el control y por la dosis (1). A su vez, el porcentaje de mortalidad causado por la dosis (4) se diferenció alta y significativamente por el causado por las dosis (2) y (3) ($F = 43,33$; $gl = 4$; $p = 0,0000$). La DL_{50} fue de $1,8 \times 10^5$ conidios/cucaracha (Tabla 8). y el TL_{50} fue de 4 días (Tabla 9).

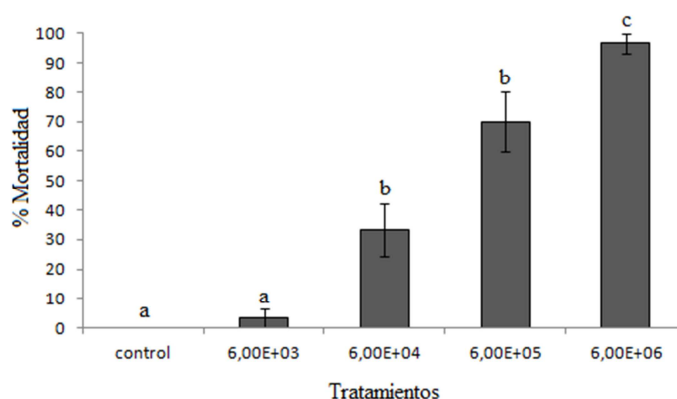


Figura 22. Porcentaje de mortalidad de ninfas de *B. dubia* causados por el hongo *M. anisopliae* obtenidos a los 20 días posteriores a la inoculación.

Las barras indican el porcentaje de mortalidad y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias significativas obtenidas por el test de Tukey ($p < 0,05$).

En la Figura 23 se muestra la mortalidad obtenida para los adultos de *B. dubia*. El mayor porcentaje de mortalidad (100 %) fue causado por la dosis (4) de 2×10^8 conidios y el valor mínimo (20 %) con la dosis (2) de 2×10^6 conidios. En el control se observó una mortalidad 3,3 %. El porcentaje de mortalidad causado por las dosis (3) y (4) se diferenció alta y significativamente del causado por el control y las dosis 1 y 2 ($F = 33,63$; $gl = 4$; $p = 0,0000$). La DL_{50} fue de $7,1 \times 10^6$ conidios/cucaracha (Tabla 8). Y con un TL_{50} de 6,5 días (Tabla 9).

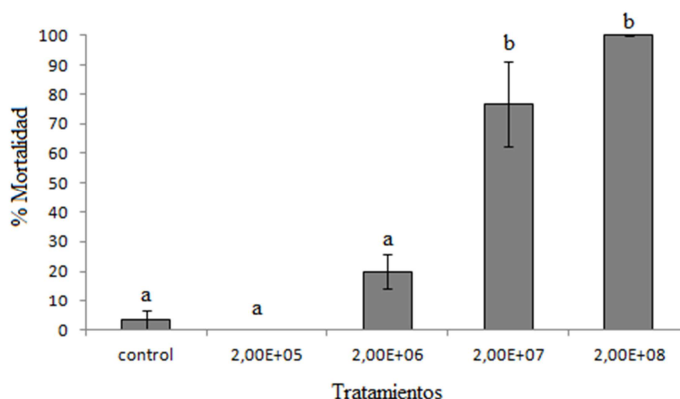


Figura 23. Porcentaje de mortalidad de adultos de *B. dubia* causados por el hongo *M. anisopliae* obtenidos a los 20 días posteriores a la inoculación por aplicación tópica.

Las barras indican el porcentaje de mortalidad y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias significativas obtenidas por el test de Tukey ($p < 0,05$).

La mortalidad de ninfas y adultos de *B. dubia*, debida a *M. anisopliae*, fue mayor del 90% en ambos estados de desarrollo. El TL_{50} fue menor para las ninfas cuando se comparó con los adultos, además el TL_{50} de los adultos fue significativamente diferente al TL_{50} de las ninfas debido a que sus límites de confianza no se traslapan (Tabla 9). Los adultos tuvieron una DL_{50} mayor que las ninfas; es decir, la DL_{50} de los adultos fue significativamente diferente al DL_{50} de las ninfas debido a que sus límites de confianza no se traslapan (Tabla 8). Una menor DL_{50} indica una mayor susceptibilidad de las ninfas de *B. dubia* al aislamiento de *M. anisopliae*, de manera que se requiere una menor concentración de conidios para eliminar el 50 % de los insectos plaga. Además las ninfas alcanzaron el 50% de mortalidad en menor tiempo al comparar con los adultos.

En la figura 24 se muestra la mortalidad obtenida para las ninfas de *P. americana*. El máximo de mortalidad (53,3 %) se observó con la dosis (4) de 6×10^6 conidios y el valor mínimo (6,7 %) con la dosis (1) de 6×10^3 conidios. Al comparar los porcentajes de mortalidad causados por las dosis (3) y (4) encontramos que se diferenciaron alta y significativamente de los causados por el control y por la dosis 1 ($F = 9,66$; $gl = 4$; $p = 0,0018$). En el control se observó una mortalidad 3,3 %. La DL_{50} fue de 3×10^6

conidios/cucaracha (Tabla 4). Y TL_{50} de 9 días (Tabla 5). En el caso de *P. americana* no existió disponibilidad de adultos para realizar el ensayo.

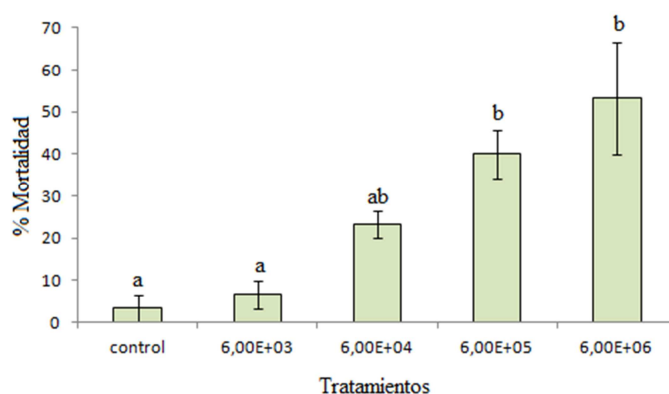


Figura 24. Porcentaje de mortalidad de ninfas de *P. americana* causados por el hongo *M. anisopliae* obtenidos a los 20 días posteriores a la inoculación por aplicación tópica.

Las barras indican el porcentaje de mortalidad y el error estándar. Las letras distintas representan las diferencias significativas obtenidas por el test de Tukey ($p < 0,05$).

En todos los bioensayos realizados los datos presentaron un buen ajuste al modelo Probit (Tabla 8). Los resultados indicaron que el valor de X^2 calculado era menor que el valor de X^2 para la heterogeneidad. Esto permitió concluir que no hay razones para dudar del modelo, es decir se presenta un buen ajuste del modelo Probit ($P > 0,05$).

En todos los casos el porcentaje de mortalidad aumentó conforme se incrementó la concentración de conidios aplicados. Los valores de DL_{50} y DL_{90} hallados para las diferentes especies de cucarachas, ninfas y adultos, se observan en la Tabla 8. Las ninfas de *B. dubia* presentaron la menor DL_{50} seguida por los adultos de *B. germanica*. Los límites de confianza de las ninfas de *B. dubia* y los adultos de *B. germanica* no se superponen con el resto de las cucarachas, indicando que existen diferencias significativas entre estos valores, (Tabla 8). Los valores observados para la DL_{90} , muestran el mismo patrón, las ninfas de *B. dubia* y los adultos de *B. germanica* presentaron la menor DL_{90} . Existen diferencias significativas entre estos valores de DL_{90} de las ninfas de *B. dubia* con el resto de las cucarachas analizadas. Es decir, los límites de confianza de las ninfas de *B. dubia* no se

superponen con ninguno de los valores observados para el resto de las cucarachas (ninfas y adultos) excepto para los adultos de *B. germanica* (Tabla 8). Además, existieron diferencias significativas entre la DL_{90} de los adultos de *B. germanica* y las ninfas de *P. americana*, debido a que no hay superposición de límites (Tabla 8).

En la tabla 9, se observan los valores de los TL_{50} hallados para las diferentes especies de cucarachas, ninfas y adultos. Las ninfas de *B. dubia* presentaron el menor TL_{50} seguida por los adultos de *B. germanica*. El TL_{50} de los adultos de *B. germanica* fue significativamente diferente al TL_{50} de las ninfas de la misma especie, debido a que sus límites de confianza no se superponen. En el resto de las cucarachas los valores de TL_{50} no presentaron diferencias significativas debido a que sus límites de confianza se superponían con los otros.

Es interesante remarcar que los adultos de *B. dubia* presentaron la mayor DL_{50} seguida por las ninfas de *B. orientalis*. Sin embargo, las ninfas de *P. americana* presentaron la mayor DL_{90} seguida por las ninfas de *B. orientalis* y *B. germanica* (Tabla 8). Estas tres ninfas fueron menos susceptibles al ataque de *M. anisopliae* en comparación con los adultos de *B. dubia* y *B. germanica*.

Las cucarachas muertas por el hongo cuando fueron colocadas en cámaras húmedas, presentaron crecimiento fúngico que emergió a través de las regiones intersegmentales del cuerpo, inicialmente blanco y, posteriormente verde-oliva, característico del hongo y del proceso de conidiogénesis (Fig. 25 y 26). Aproximadamente entre el 10 y 30% de las cucarachas muertas no esporularon.

Tabla 8. Dosis letal media (DL₅₀) de adultos y ninfas de cucarachas tratadas con *Metarhizium anisopliae* CEP085 por aplicación tópica.

Especie	A/N ^a	n	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	X ²	DL ₅₀	LC 95%	DL ₉₀	LC 95%
<i>B. orientalis</i>	A	150	-	-	-	N/S	-	-	-
<i>B. dubia</i>	A	150	-7,10 ± 2,3	1,76 ± 0,33	0,96	7,1x10 ⁶ b	4,0x10 ⁶ – 1,2x10 ⁷	4,0x10 ⁷ bc	2x10 ⁷ – 1,0x10 ⁸
<i>B. germanica</i>	A	150	0,02 ± 0,9	0,92 ± 0,17	0,01	2,7x10 ⁵ a	1,0x10 ⁵ – 6,0x10 ⁵	6,6x10 ⁶ ab	2x10 ⁶ – 4,0x10 ⁷
<i>B. orientalis</i>	N	150	0,04 ± 1,7	0,73 ± 0,27	1,22	5,5x10 ⁶ b	1,6x10 ⁶ – 1,5x10 ⁸	3,0x10 ⁸ bc	3x10 ⁷ – 1,8x10 ⁸
<i>B. dubia</i>	N	150	-1,00 ± 0,9	1,15 ± 0,17	0,48	1,8x10 ⁵ a	9,6x10 ⁴ – 3,2x10 ⁵	2,3 x10 ⁶ a	1x10 ⁶ – 8,0x10 ⁶
<i>B. germanica</i>	N	150	0,70 ± 0,8	0,65 ± 0,14	0,04	3,4x10 ⁶ b	1,2x10 ⁶ – 2,0x10 ⁷	3,0x10 ⁸ bc	4x10 ⁷ – 3,0x10 ¹⁰
<i>P. americana</i>	N	150	1,60 ± 0,8	0,50 ± 0,1	0,80	3,0 x10 ⁶ b	9,0x10 ⁵ – 4,0x10 ⁷	9,0x10 ⁸ c	6x10 ⁷ – 3,0x10 ¹²

Los valores de DL₅₀ seguidos por la misma letra no muestra diferencias significativas debido al traslape de los límites de confianza.; ^a A: adulto, N:ninfa; n: número de insectos evaluados.; DE: desviación estándar.; LC: límites de confianza.

Tabla 9. Tiempo letal medio (TL₅₀) de adultos y ninfas de cucarachas tratadas con *M. anisopliae* CEP085 por aplicación tópica.

Especie	A/N ^a	n	TL ₅₀	LC 95%
<i>B. orientalis</i>	Ad	150	N/S	-
<i>B. dubia</i>	Ad	150	6,5 AB	4,4 – 11,8
<i>B. germanica</i>	Ad	150	5,6 A	4,5 – 7,5
<i>B. orientalis</i>	Ni	150	6,8 AB	5,0 – 10,6
<i>B. dubia</i>	Ni	150	4,0AB	1,3 – 12,8
<i>B. germanica</i>	Ni	150	10,6 B	9,0 – 12,8
<i>P. americana</i>	Ni	150	9,0AB	5,0– 18,0

Los valores de TL₅₀ seguidos por la misma letra no muestra diferencias significativas debido a la superposición de los límites de confianza. ^aAd: adulto, Ni: ninfa; n: número de insectos evaluados; LC: límites de confianza.

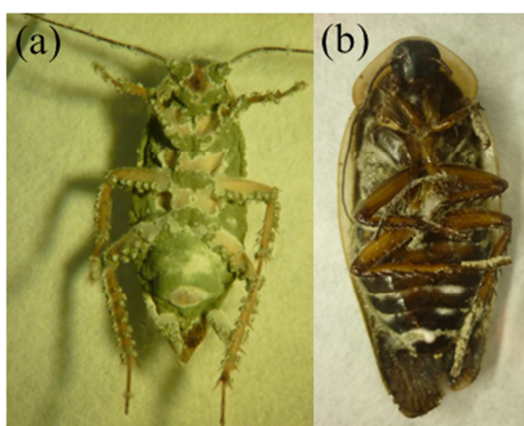


Figura 25. Adultos de (a) *B. germanica*, (b) *B. dubia* infectados con con *M. anisopliae* .

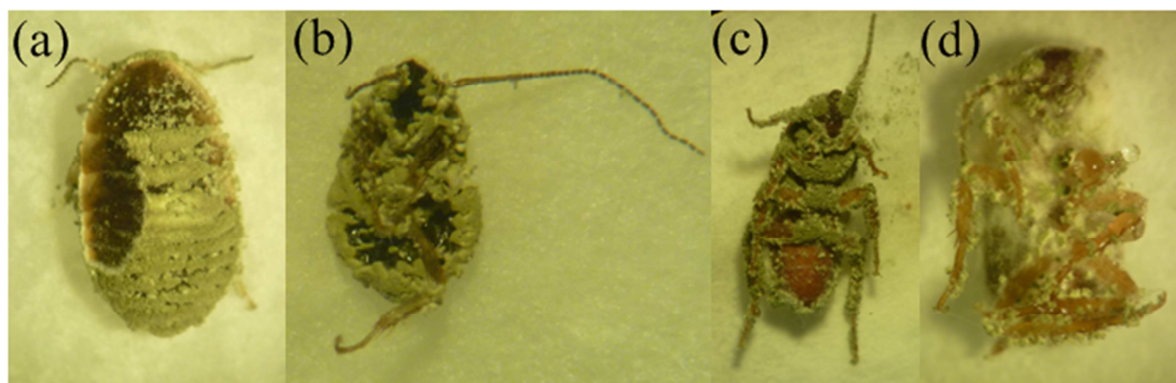


Figura 26. Ninfas de (a) *B. dubia*, (b) *B. germanica*, (c) *B. orientalis*, (d) *P. americana* infectadas con *M. anisopliae*.

Inyección de blastosporas de *M. anisopliae* a ninfas de *P. americana*

En todos los casos se encontró más del 95% de viabilidad de los conidios y blastosporas usados en los ensayos. Después de inyectar las dosis 2×10^5 a 6×10^3 blastosporas/insecto, las blastosporas fueron detectadas hasta 3 días después de la inyección, en ambos tratamientos.

Las dosis de blastosporas tuvieron un efecto altamente significativo en el número de blastosporas en la hemolinfa en el primer ($F_{4,15} = 9,18$; $P = 0,0006$; 2×10^5 blastosporas > dosis restantes probadas) y en el segundo día ($F_{4,13} = 10,98$; $P = 0,0004$; 2×10^5 blastosporas > 6×10^4 blastosporas y 2×10^4 blastosporas > 6×10^3 blastosporas), pero no en el tercer día ($F_{3,11} = 2,52$; $P = 0,1$).

El primer día después de la inyección, solo en la dosis más alta (2×10^5 blastosporas) se detectaron blastosporas en la hemolinfa en concentraciones que variaron desde 0 a $3,5 \times 10^4$ blastosporas/ μ l de hemolinfa entre las diferentes repeticiones. A las 48 horas post tratamiento el número de blastosporas en la hemolinfa aumentó hasta un máximo de $4,6 \times 10^5$ blastosporas/ μ l de hemolinfa, las ninfas con esta dosis no sobrevivieron más de 48 horas (Tabla 10). También se detectaron blastosporas a las 48 horas con las dosis de 6×10^4 y 2×10^4 blastosporas/insecto, y con la dosis de 6×10^3 blastosporas solo se detectaron blastosporas en la hemolinfa de una ninfa (Tabla 10). A las 72 horas fue posible aislar blastosporas de la hemolinfa de una ninfa con la dosis 6×10^4 blastosporas, de 5 ninfas con la dosis de 2×10^4 blastosporas y de dos ninfas con la

dosis de 6×10^3 blastosporas, en todas las réplicas. A las 72 horas pos tratamiento no se detectaron blastosporas en la hemolinfa de varias ninfas analizadas (Tabla 10). Con la dosis menor (2×10^3 blastosporas) nunca se detectaron blastosporas en la hemolinfa durante los 10 días que duro el ensayo. En los días siguientes el número de blastosporas detectadas en la hemolinfa fue cero, independientemente de la dosis probada (Tabla 10).

Se obtuvieron resultados comparables con las UFC/ μ l de hemolinfa, las UFC se desarrollaron a partir de la hemolinfa sembrada en el medio de cultivo a partir del primer y hasta el tercer día después de la inyección (Tabla 10).

La infección se mantiene en la hemolinfa durante un máximo de 72 horas y un mínimo de 48 horas. Las blastosporas de *M. anisopliae* fueron fácilmente visibles en la hemolinfa después de la inyección durante las primeras 72 horas cuando las ninfas fueron inyectadas con las tres dosis más altas (Fig. 27a). Si bien, esto es un ensayo preliminar, permite inferir que la respuesta inmune celular de las ninfas de *P. americana* puede responder y atacar a la infección fúngica, ya que con las dosis más bajas de 2×10^4 y 6×10^3 blastosporas en más del 50% de las ninfas no se detectaron blastosporas en la hemolinfa. Sin embargo, con las dos dosis más altas, en más del 50% de las ninfas analizadas se detectaron blastosporas en la hemolinfa.

Las ninfas con síntomas de infección fúngica mostraron movilidad reducida, espasmos y no respondieron a la estimulación mecánica, esto se observó principalmente en las tres dosis mayores inyectadas dentro de las 24 a 72 horas pos tratamiento. Todas las cucarachas que murieron y se colocaron en cámaras húmedas se observó esporulación debida a *M. anisopliae* (Fig. 27b).

Tabla 10. Promedio de blastosporas / μ l hemolinfa y unidades formadoras de colonia (UFC) / μ l hemolinfa, de ninfas de *P. americana* tratadas por inyección con *M. anisopliae* durante los 10 días que duro el ensayo.

Dosis	Blastosporas/ μ l hemolinfa									
	Días después de la inoculación									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2×10^5	$1,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^5$	-	-	-	-	-	-	-	-
6×10^4	0	$9,9 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4 \bullet$	0	0	-	-	-	-	-
2×10^4	0	$4,3 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	0	0	0	0	0	-	-
6×10^3	0	$1,3 \times 10^4 \bullet$	$4,5 \times 10^3 \bullet\bullet$	0	0	0	0	0	0	-
2×10^3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dosis	UFC / μ l hemolinfa									
	Días después de la inoculación									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2×10^5	$1,5 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	-	-	-	-	-	-	-	-
6×10^4	$1,7 \times 10^2$	$3,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6 \bullet$	0	0	-	-	-	-	-
2×10^4	7	$4,6 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	0	0	0	0	0	-	-
6×10^3	1 \bullet	13 $\bullet\bullet$	$2,3 \times 10^3$	0	0	0	0	0	0	-
2×10^3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Se utilizaron 80 ninfas de *P. americana* por dosis, más el control, se testearon 8 ninfas por día, y se obtuvo el promedio, excepto en la (-) muerte de los insectos durante el tratamiento con el hongo *M. anisopliae* que no se pudo extraer más hemolinfa. (\bullet) Aislamiento de blastosporas desde la hemolinfa en un insecto. ($\bullet\bullet$) Aislamiento de blastosporas desde la hemolinfa de dos insectos.

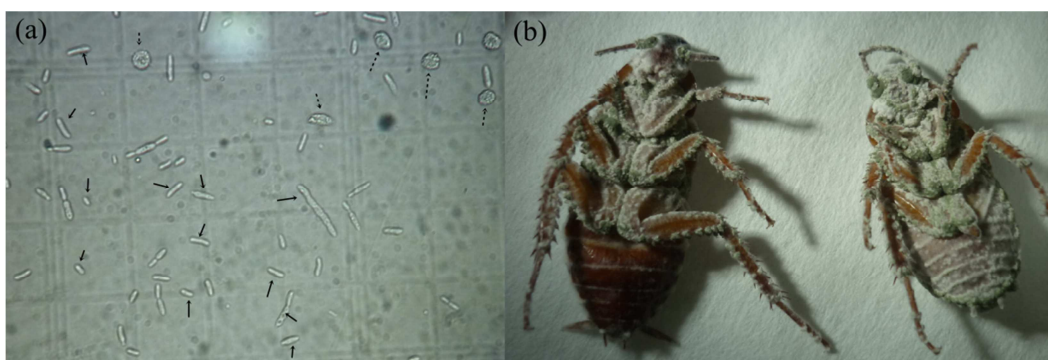


Figura 27. (a) Conteo de blastosporas en la hemolinfa de *P. americana*, (flecha continua: blastosporas y flecha discontinua: hemocitos). (b) Ninfas de *P. americana* infectadas con *M. anisopliae*.

Pruebas preliminares para la producción masiva de hongos entomopatógenos y su uso en cebos para control de cucarachas

El promedio en rendimiento y viabilidad de las bolsas de arroz parbolizado a los 14 días pos-inoculación fue más elevado en *M. anisopliae* cepa 085 con un rendimiento de $5,95 \times 10^7$ conidios por gramo de arroz y una viabilidad de 97.89 % (porcentaje de germinación).

Tabla 1. Promedio en rendimiento y viabilidad de las bolsas de arroz parbolizado a los 14 y 20 días de incubación.

cepa fúngica	sustrato	días	Rendimiento	
		incubación	(conidios/gr arroz)	% de germinación
<i>M.anisoplae</i> CEP 085	arroz parboil	14	$5,95 \times 10^7$	97,89
<i>B.bassiana</i> CEP 077	arroz parboil	14	$1,33 \times 10^7$	97,15
<i>M. anisopliae</i> CEP 085	arroz parboil	20	$4,43 \times 10^7$	94,34
<i>B. bassiana</i> CEP 077	arroz parboil	20	$7,5 \times 10^6$	95

El ensayo preliminar realizado para determinar si el arroz inoculado con el hongo funcionaba como cebo para las cucarachas, no fue efectivo, las cucarachas no se

alimentaron con el arroz y no se obtuvo mortalidad. Es preciso profundizar este tema, mediante la búsqueda de nuevos cebos. También se debe investigar la atracción de este cebo de arroz con cantidades decrecientes de conidios ya que pudo suceder que al estar muy esporulado el hongo, hizo que el arroz tratado no resultara atractivo como alimento para las cucarachas.

La producción de inóculo fúngico en sustrato arroz fue exitosa, alcanzando a los 14 días el máximo de producción de conidios. Aunque no funcionó como “cebo” de atracción para las cucarachas en estos resultados preliminares.

Determinación por cromatografía gaseosa de los ácidos grasos cuticulares de cinco especies de cucarachas.

El análisis de los ácidos grasos de ésteres metílicos por cromatografía de gases indicó que todos los ácidos grasos eran en su mayoría de cadena lineal, de cadena larga, saturados o insaturados (Tabla 11). El contenido de ácidos grasos presentes en la cutícula de las especies de cucarachas consistió en cadenas de 11 a 24 átomos de carbono. Hubo un marcado predominio de ácidos grasos que contienen de 16 a 18 átomos de carbono. En las cinco especies de cucarachas estudiadas los ácidos grasos que predominaron en las muestras analizadas fueron: el ácido oleico ($C_{18:1\ n9c}$), el ácido linoleico ($C_{18:2\ n6}$), el ácido palmítico ($C_{16:0}$) y el ácido esteárico ($C_{18:0}$) (Tabla 11; Fig. 28 y 29). El ácido oleico ($C_{18:1\ n9c}$) fue el que se detectó con mayor porcentaje en todas las muestras analizadas, predominando entre un 30 y 60% del total de los ácidos grasos presentes en las muestras.

Solamente en las muestras analizadas de adultos de *B. orientalis* fueron detectados el ácido miristoleico ($C_{14:1\ n5}$), el ácido γ -linolénico ($C_{18:3n6}$), el ácido araquídico ($C_{20:0}$), el ácido eicosadienoico ($C_{20:2}$) y el ácido behénico ($C_{22:0}$) (Fig. 29 A). El ácido lignocérico ($C_{24:0}$) se detectó sólo en ninfas de *B. orientalis*, *P. americana* y *P. fuliginosa* (Fig. 29). En los adultos de *B. dubia* se detectaron los ácidos heneicosanoico ($C_{21:0}$) y ácido decosaheptaenoico DHA ($C_{22:6\ n-3}$) (Fig. 28 B). Solo en adultos de *P. americana* se detectó el ácido láurico ($C_{12:0}$) (Fig. 29 B). El ácido

araquidónico ($C_{20:4n6}$) se detectó solo en los adultos de *P. americana* y *P. fuliginosa* (Fig. 29 B y C). En las muestras analizadas de las ninfas de *P. fuliginosa* se detectó ácido undecanoico ($C_{11:0}$) que alcanzó casi el 50% del total de los ácidos detectados (Fig. 29 C), este ácido solo aparece en los adultos de *P. americana* en un porcentaje que no supera el 0,2% (Tabla 11). Las diferencias en la composición de los ácidos grasos cuticulares entre las especies de cucarachas y las etapas de desarrollo, se presentan en la figura 28 y 29, y en la tabla 11. En la figura 30 se observan los resultados de algunas de las la cromatografía gaseosa de las cinco especies de cucarachas analizadas.

Tabla 11. Contenido de ácidos grasos en los lípidos de la cutícula de ninfas y adultos de cinco especies cucarachas urbanas.

<i>Ácidos grasos</i>	<i>Blatta orientalis</i> *		<i>Blaptica dubia</i> *		<i>Blattella germanica</i> *		<i>Periplaneta americana</i> *		<i>Periplaneta fuliginosa</i> *	
	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto
C _{11:0}	-	-	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,01	49,1	-
C _{12:0}	-	-	-	-	-	-	-	0,3 ± 0,02	-	-
C _{14:0}	-	0,4 ± 0,1	-	-	-	0,7 ± 0,1	-	0,2 ± 0,03	-	-
C _{14:1 n5}	-	1,4 ± 0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{15:0}	0,8	0,4 ± 0,2	1,4	-	1,8	3,2 ± 0,3	1,6	0,7 ± 0,1	-	1,3 ± 0,2
C _{15:1 n9}	0,4	-	-	-	-	0,6 ± 0,2	-	-	-	-
C _{16:0}	25	11 ± 5,3	21,2	8,2 ± 1,4	36,3	22,5 ± 1,5	24,5	9,19 ± 2,2	16,4	8,7 ± 3
C _{16:1 n7}	2,2	1,1 ± 1	4,9	1,1 ± 0,7	-	3,3 ± 1,3	-	1 ± 0,16	-	1,2 ± 0,6
C _{17:0}	0,8	0,2 ± 0,1	-	0,3 ± 0,1	-	-	1,7	0,4 ± 0,03	-	-
C _{18:0}	8,7	7,2 ± 1,4	5,4	9,8 ± 2,3	25,9	8,3 ± 4	11,8	8,4 ± 0,2	2,6	6,5 ± 0,6
C _{18:1 n9 c}	42,8	55,3 ± 7,3	42,6	59 ± 6	29,9	43,2 ± 0,2	30,1	50,4 ± 4,9	30,7	57,9 ± 8,2
C _{18:1 n9 t}	-	1,3 ± 1	-	3,4 ± 0,3	-	2,4 ± 1	-	1,7 ± 1,4	-	0,17 ± 0,05
C _{18:2 n6}	16,7	18,2 ± 3,7	23,1	16,1 ± 2	6,1	14,9 ± 2	28,3	17,6 ± 0,9	-	16,2 ± 1,7
C _{18:3 n3}	0,9	1 ± 0,1	1,4	1,4 ± 0,2	-	0,9 ± 0,1	-	1,2 ± 0,2	-	1,3 ± 0,2
C _{18:3 n6}	-	0,4 ± 0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{20:0}	-	0,4 ± 0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{20:2}	-	0,2 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{20:4 n6}	-	-	-	-	-	-	-	8,71 ± 0,1	-	6,7 ± 3
C _{21:0}	-	-	-	0,2 ± 0,1	-	-	-	-	-	-
C _{22:0}	-	1,5 ± 0,6	-	-	-	-	-	-	-	-
C _{22:6 ω3}	-	-	-	0,5 ± 0,3	-	-	-	-	-	-
C _{24:0}	1,7	-	-	-	-	-	2,1	-	1,2	-
Sum	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

(*) % peso/peso: (%) relativo de ácidos grasos en las muestras analizadas. Los datos presentan la media ± el desvío estándar del análisis de muestras analizadas en diferentes tiempos.

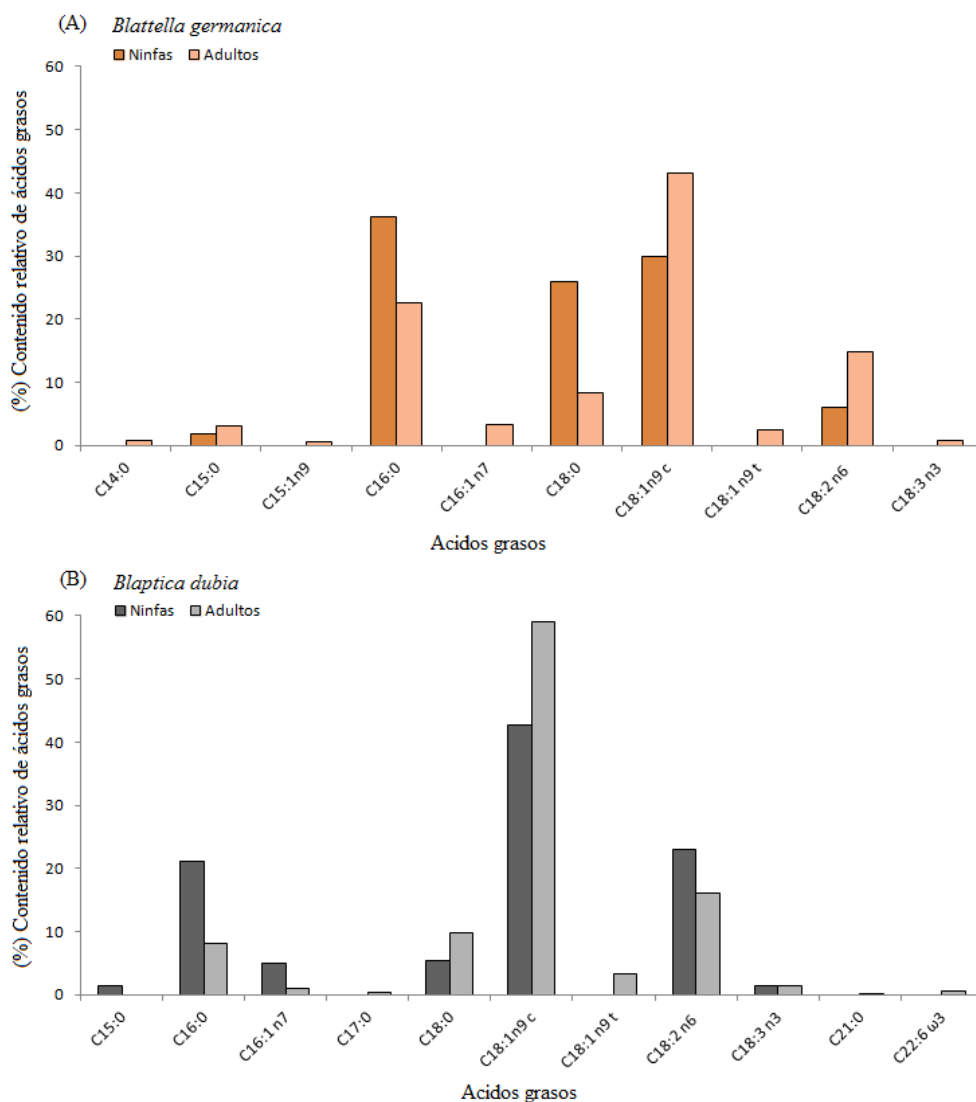


Figura 28. Composición de los ácidos grasos libres en los extractos de los lípidos cuticulares de *B. germanica* (A) y *B. dubia* (B). Ácido mirístico (C_{14:0}), ácido pentadecanoico (C_{15:0}), ácido pentadecenoico (C_{15:1n9}), ácido palmítico (C_{16:0}), ácido palmitoleico (C_{16:1n7}), ácido margárico (C_{17:0}), ácido esteárico (C_{18:0}), ácido oleico (C_{18:1n9c}), ácido eláídico (C_{18:1n9t}), ácido linoleico (C_{18:2n6}), ácido α -linolénico (C_{18:3n3}), ácido heneicosanoico (C_{21:0}), ácido behénico (C_{22:0}), ácidodocosahexaenoico o DHA (C_{22:6n3}), ácido lignocérico (C_{24:0}).

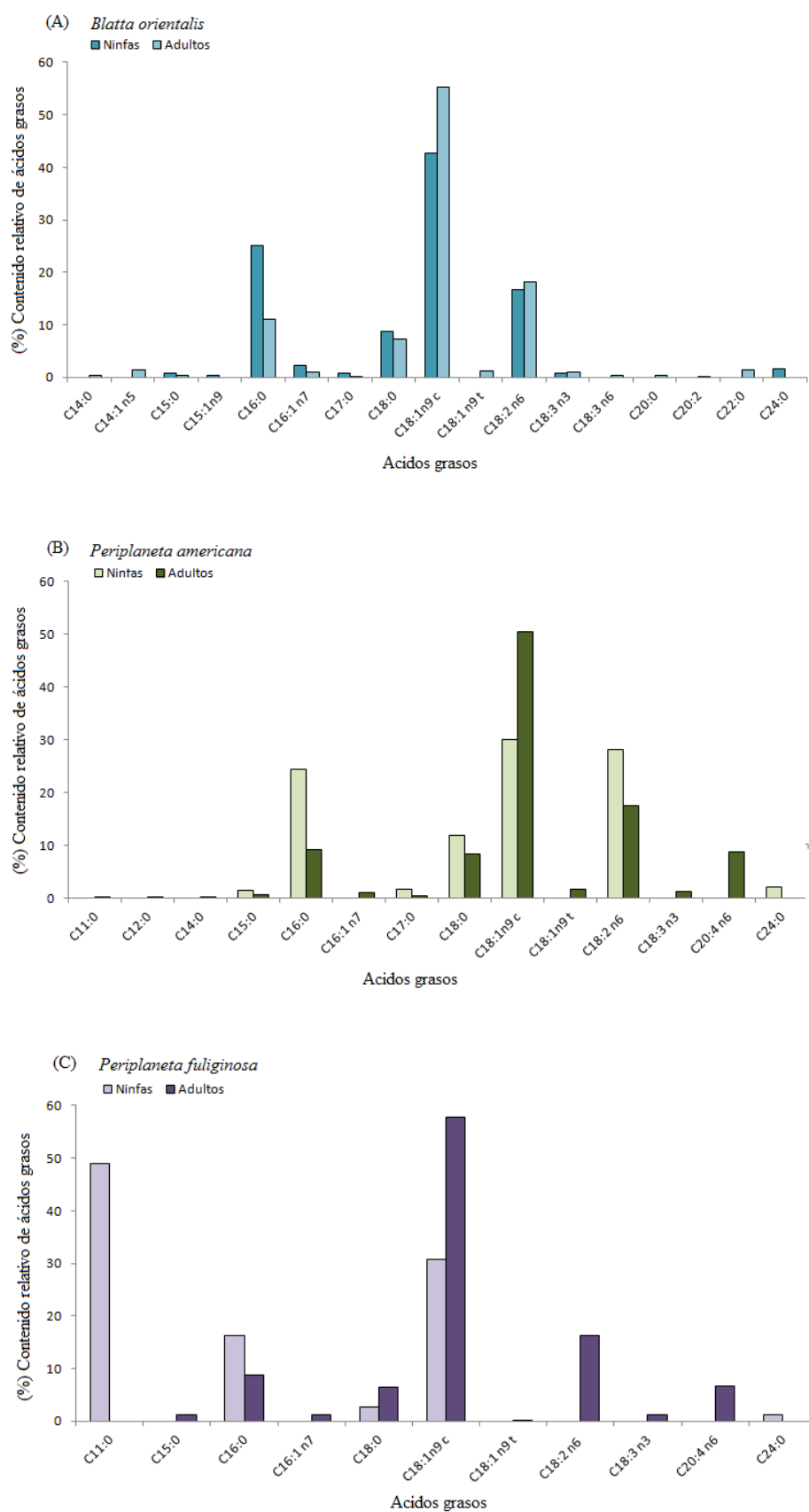


Figura 29. Composición de los ácidos grasos libres en los extractos de los lípidos cuticulares de *B. orientalis* (A), *P. americana* (B) y *P. fuliginosa* (C). Acido

undecanoico ($C_{11:0}$), ácido láurico ($C_{12:0}$), ácido mirístico ($C_{14:0}$), ácido miristoleico ($C_{14:1n5}$), ácido pentadecanoico ($C_{15:0}$), ácido pentadecenoico ($C_{15:1n9}$), ácido palmítico ($C_{16:0}$), ácido palmitoleico ($C_{16:1n7}$), ácido margárico ($C_{17:0}$), ácido esteárico ($C_{18:0}$), ácido oleico ($C_{18:1n9c}$), ácido eláidico ($C_{18:1n9t}$), ácido linoleico ($C_{18:2n6}$), ácido α -linolénico ($C_{18:3n3}$), ácido γ -linolénico ($C_{18:3n6}$), ácido araquídico ($C_{20:0}$), ácido eicosadienoico ($C_{20:2}$), Ácido araquidónico ($C_{20:4n6}$), ácido behénico ($C_{22:0}$), ácido lignocérico ($C_{24:0}$).

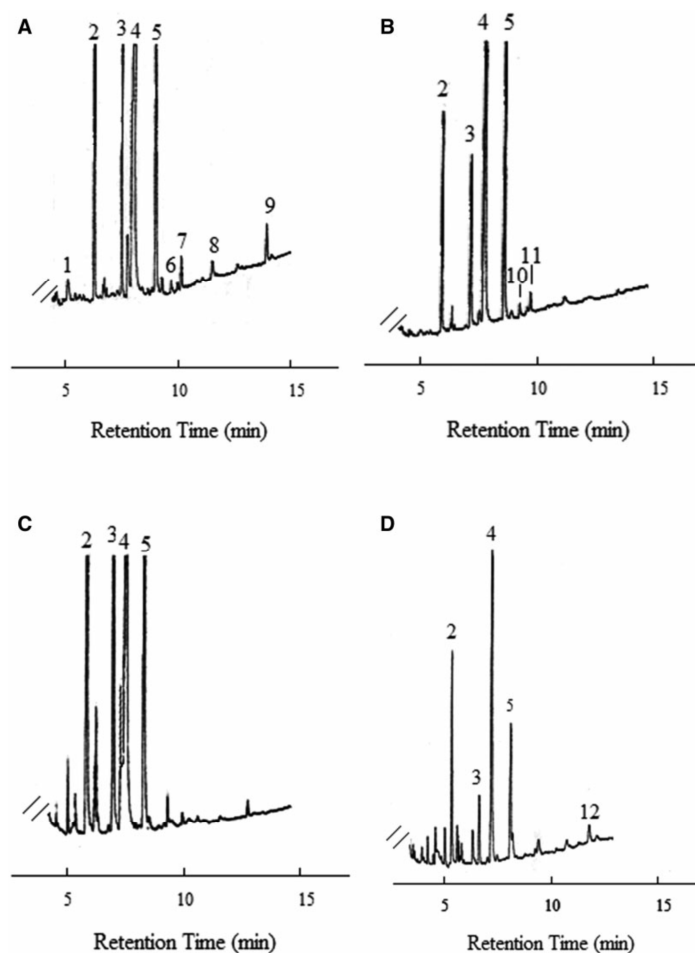


Figura. 30. Cromatografía gaseosa de los extractos de ácidos grasos cuticulares de algunas de las cucarachas analizadas, adultos de (A) *B. orientalis*; (B) *B. dubia* (C) *B. germanica*, y (D) ninfas de *B. orientalis*. (1) ácido miristoleico ($C_{14:1n5}$); (2) ácido palmítico ($C_{16:0}$); (3) ácido esteárico ($C_{18:0}$); (4) ácido oleico ($C_{18:1n9c}$); (5) ácido linoleico ($C_{18:2n6}$); (6) ácido γ -linolénico ($C_{18:3n6}$); (7) ácido araquídico ($C_{20:0}$); (8) ácido eicosadienoico ($C_{20:2}$); (9) ácido behénico ($C_{22:0}$); (10) ácido heneicosanoico ($C_{21:0}$); (11) ácidodocosahexaenoico o DHA ($C_{22:6n3}$); (12) ácido lignocérico ($C_{24:0}$).

DISCUSIÓN

A través de la prospección de patógenos en cucarachas detectamos la presencia de tres especies de *Herpomyces* parasitando a tres especies diferentes de cucarachas. *H. ectobiae* sobre *B. germanica*, *H. periplanetae* sobre *P. americana* y *H. stylopygae* sobre *P. fuliginosa*. Estas tres especies ya fueron citadas por Spegazzini (1917) para la República Argentina, en este caso ampliamos la lista de hospedadores para *H. stylopygae* que fue encontrado parasitando las antenas de adultos de *P. fuliginosa*. Si bien este hongo fue descrito sobre *B. orientalis*, hay ciertas especies de Laboulbeniales que pueden infectar a hospedantes que pertenecen a un mismo género, a una misma familia o incluso infectar insectos de distintos órdenes.

En los Laboulbeniales es importante al momento de adherirse a un hospedador la especie y el grosor del tegumento del artrópodo (Majewski, 1994). Por este motivo, algunas especies de *Laboulbeniales* sólo pueden crecer en zonas del cuerpo con un tegumento más delgado, como las antenas (Majewski, 1994). Hammond (1995) sugiere que las características de la cutícula y de las propias defensas del hospedante juegan un papel importante para que una infección tenga éxito (Santamaria, 2001). Hay que tener en cuenta que la infección se adquiere por contactos directos entre los individuos, a través del contacto sexual (Santamaria, 2001) o a través de la intervención del entorno (suelo) (De Kesel, 1995) y el comportamiento de limpieza de las cucarachas podría jugar un papel en la disminución de los hongos. Esto puede explicar, en parte, que los hongos se hayan encontrado solo en las antenas de las cucarachas pertenecientes a la colonia de laboratorio, y que el nivel de infección entre los individuos no haya sido muy alto, ya que muchos insectos no presentaban infección fúngica. La mayoría de las especies de *Laboulbeniales* sólo han sido observadas sobre hospedantes adultos (Santamaría, 2001) y las infecciones en ninfas se pierden cuando la ninfa muda, las infecciones en adultos persisten durante toda la vida. Sin embargo, las ninfas que han perdido el hongo en la muda pueden volver a infectarse. Roth & Willis, 1960 consideran que las ninfas pueden estar infectadas con *Herpomyces*, en nuestro estudio no encontramos ninguna ninfa parasitada. Roth & Willis, 1960 citan varias especies de cucarachas que se encuentran parasitadas por *Laboulbeniales* en diferentes partes del cuerpo.

En el muestreo realizado a campo sobre cucarachas silvestres se detectaron cucarachas con síntomas de infección fúngica, se realizó el aislamiento y

caracterización de los hongos en el laboratorio y la especie determinada fue *M. anisopliae*. Se pudieron aislar tres cepas del mencionado hongo y se realizaron los bioensayos, utilizando ninfas de *B. germanica*, para comprobar la patogenicidad del hongo. Las mortalidades oscilaron entre 30 y 70%. Aún restan realizar más ensayos para determinar el rango de patogenicidad de las cepas aisladas en diferentes especies de cucarachas. Este sería el primer registro de *M. anisopliae* aislado bajo condiciones naturales a partir de cucarachas a nivel mundial. Existe solo una cita de *M. anisopliae* descrita en la revisión realizada por Roth & Willis, 1960 pero no hay registros de estos hongos en ninguna colección y tampoco detallan si se comprobó su patogenicidad.

Al evaluar la patogenicidad de hongos entomopatógenos aislados de diferentes insectos, se determinó que *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron los más patogénicos y al evaluar la agresividad de las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* por contacto directo se determinó que *M. anisopliae* fue más agresivo presentando menor tiempo de mortalidad.

Cuando se trataron por contacto directo, los adultos de *B. germanica* fueron más susceptibles a la infección por los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* en comparación con las ninfas de la misma especie. Este resultado se repitió con el tratamiento de cebo con *M. anisopliae*. Al comparar ambos tratamientos, el tratamiento de contacto directo fue más efectivo que el cebo, debido a que podrían llegar a tener contacto con un mayor porcentaje de conidios en comparación con el cebo. Además se debe tener en cuenta que la infección también puede ocurrir a través de aberturas naturales, tales como la boca, penetración *per os*. Hubner-Campos *et al.* (2013) realizó una prospección de varias especies de hongos entomopatógenos sobre *P. americana*, realizó aplicación tópica con una emulsión con aceite y los resultados mostraron que los adultos fueron altamente susceptibles, seguidos por las ninfas, y las ootecas fueron las más resistentes a la infección con *M. anisopliae*, coincidiendo con nuestros resultados. Otros trabajos estaban relacionados con la virulencia, la transmisión y la susceptibilidad diferencial de ninfas y adultos de *B. germanica* a *M. anisopliae*; determinaron que *M. anisopliae* tiene un potencial para disminuir el número de cucarachas de *B. germanica* en el corto y largo plazo (Quesada Moraga *et al.* 2004). En el trabajo de Lopes & Alves (2011), al tratar por aplicación tópica, cebo y contacto con *M. anisopliae*, los adultos de *B. germanica* resultaron más susceptibles que las ninfas, coincidiendo con nuestros resultados. La mayor mortalidades en el uso de *M. anisopliae* la generó la formulación en polvo, en comparación con el cebos (Lopes & Alves 2011). Estos investigadores

informaron que la supervivencia de ninfas de *B. germanica* no se vio afectada cuando fueron tratadas con cebos de *M. anisopliae*, sin embargo los adultos registraron tasas de mortalidad del 28% después de 15 días después de la aplicación, coincidiendo con nuestros resultados. Murali Mohan *et al.* (1999) probaron tres métodos diferentes, contacto directo con las esporas, cebo, y por pulverización de esporas en suspensión acuosa para el control de ninfas y adultos de *P. americana* con *B. bassiana*, los resultados mostraron que la aplicación por pulverización fue más efectiva, seguida por el cebo. En ninguna de los trabajos mencionados en la bibliografía el cebo resultó la mejor opción, coincidiendo con nuestros resultados. Podemos concluir que las cepas de *M. anisopliae* (CEP 085) y *B. bassiana* (CEP 077) mostraron un buen potencial como agentes de control biológico de ninfas y adultos *B. germanica* por el tratamiento del contacto directo.

Este es el primer estudio que describe la susceptibilidad de ninfas y de adultos de *B. orientalis* y *B. dubia*, en laboratorio, a *M. anisopliae*. En primer lugar, fue posible estimar la susceptibilidad al hongo *M. anisopliae* de las ninfas de *P. americana*, ninfas y adultos de *B. germanica*, *B. orientalis* y *B. dubia* a través TL_{50} y DL_{50} . En segundo lugar, los adultos de *B. orientalis* no fueron susceptibles al aislamiento del hongo entomopatógeno probado. Los adultos de *B. germanica* y las ninfas y adultos de *B. dubia* mostraron un nivel de mortalidad $>90\%$, mientras que en ninfas de *B. germanica*, *B. orientalis* y *P. americana* no superaron el 60% de mortalidad. Estos resultados mostraron que la susceptibilidad a *M. anisopliae* tiene relación con la especie de cucaracha analizada y las etapas de desarrollo del insectos, como se informó anteriormente para *B. germanica* por López y Alves (2011), y Hernandez-Ramirez *et al.* (2007) probaron varios aislamientos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, por aplicación tópica, contra ninfas y adultos de *P. americana* observaron que la mortalidad de las cucarachas tratadas se redujo conforme aumento su edad y la humedad relativa (HR) de $85 \pm 10\%$ generó mayor mortalidad.

Tanto por aplicación tópica, contacto directo y cebo se observó una susceptibilidad diferencial entre las diferentes etapas de desarrollo. La muda se ha informado que puede ser un factor importante en la resistencia de los insectos a la infección por hongos entomopatógenos, particularmente cuando el intervalo de tiempo entre sucesivas mudas es corto (Lopes & Alves, 2011; Ekesi & Maniania, 2000). Otra causa de la diferencia en la susceptibilidad de las cucarachas puede ser la composición

cuticular. Sosa Gómez (1997) demostró que la extracción de los lípidos cuticulares con disolventes redujo significativamente la adherencia de los conidios de *M. anisopliae* a la cutícula de *Nezara viridula*. Se han reportado varios estudios sobre la composición de los lípidos cuticulares en diferentes especies de insectos. Estas investigaciones demostraron la importancia de los componentes cuticulares sobre la acción de los microorganismos (Gołębiowski *et al.*, 2011; James *et al.*, 2003; Saito & Aoki, 1983). Los ácidos grasos cuticulares tienen un profundo efecto sobre la diferenciación y germinación de las esporas fúngicas: pueden ser tóxicos, fungistático, o de vez en cuando, para algunas especies patógenas, estimulantes (Gillespie *et al.*, 2000; Boguś *et al.*, 2010). En nuestros estudios, el análisis de los lípidos cuticulares de las cinco especies de cucarachas analizadas mostró que la mayoría de los ácidos grasos extraídos tenían cadenas de 11-24 átomos de carbono. El mayor porcentaje de ácidos grasos detectados en las muestras presentaron cadenas de 15 a 18 átomos de carbono. En la literatura se ha informado con frecuencia en la estructura de los ácidos grasos epicuticulares de insectos la presencia de 1, 2 o 3 dobles enlaces. Por ejemplo, los ácidos grasos $C_{16:1}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ que se encuentran en los lípidos de la cutícula aislados a partir de adultos y larvas de *Lasioderma serricorne* (Baker *et al.*, 1979), y el mismo perfil se detectó en los lípidos de larvas y adultos *F. canicularis* (Kerwin, 1984). Se detectaron un 60% de ácidos grasos insaturados en las muestras de ninfas y adultos de *B. orientalis*, *B. dubia* y *P. americana*, adultos de *B. germanica* y *P. fuliginosa*. Las ninfas de *B. germanica* mostraron una relación inversa, con >50% de ácidos grasos saturados presentes en las muestras analizadas. En todas las ninfas analizadas el ácido palmítico se presenta en un porcentaje mayor al 15%, en los adultos no supera el 10% excepto en los adultos de *B. germanica*. En nuestro estudio encontramos que en todas las muestras analizadas el mayor porcentaje de ácidos grasos detectados por cromatografía de gases en las cucarachas analizadas fueron el ácido oleico ($C_{18:1n9c}$), el ácido palmítico ($C_{16:0}$) y el ácido linoleico ($C_{18:2n6}$). Dentro de estos tres ácidos el que predominó fue el ácido oleico con alrededor del 50% del total de los ácidos presentes en cada muestra. Todas las cucarachas analizadas presentaron un perfil de ácidos grasos diferentes tanto entre especies como entre diferentes etapas de desarrollo. Otros estudios han identificado los lípidos cuticulares de *Periplaneta australasiae*, *P. brunnea* y *P. fuliginosa* (Jackson, 1970). Said *et al.* (2005) identificó los hidrocarburos cuticulares presentes en cuatro especies de *Periplaneta*. En este trabajo pretendemos iniciar los

estudios para poder determinar, en un futuro, el papel que cumplen los lípidos y ceras superficiales en la patogénesis fúngica.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen S.O. (2004). Chlorinated tyrosine derivatives in insect cuticle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1079–1087.
- Baker J.E., Sukkestad D.R., Nelson D.R., Fatland, C.L. (1979). Cuticular lipids of larvae and adults of the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne*. *Insect. Biochem.* 9, 603-611.
- Benjamin R.K. (1971). Introduction and supplement to Roland Thaxter's contribution towards a monograph of the Laboulbeniaceae. *Biblioth. Mycol.* 30: 1-155.
- Benjamin R.K. (1986). Laboulbeniales on semiaquatic Hemiptera. V. *Triceromyces*: with a description of monoecious-dioecious dimorphism in the genus. *Aliso.* 11(3): 245-278.
- Boguś M.I., Czygier M., Gołębiowski M., Kędra E., Kucińska J., Mazgajska J., Samborski J., Wieloch W., Włóka E. (2010). Effects of insect cuticular fatty acids on *in vitro* growth and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. *Exp. Parasitol.* 125, 400–408.
- Boucias D.G. & Pendland J.C. (1984). Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 288–292.
- Boucias D.G & Pendland. (1998). Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts. USA. 537pp.
- De Kesel A. (1995). Relative importance of direct and indirect infection in the transmission of *Laboulbenia slackensis* (Ascomycetes, Laboulbeniales). *Belg. J. Bot.* 128(2): 124-130.

- Ekesi S. & Maniania N. K. (2000). Susceptibility of *Megalurothrips sjostedti* developmental stages to *Metarhizium anisopliae* and the effects of infection on feeding, adult fecundity, egg fertility and longevity. *Entomol. Exp. Appl.* 94, 229-236.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226(1):497-509.
- Gemeno C., Zurek L., Schal C. (2004). Control of *Herpomyces* spp. (Ascomycetes: Laboulbeniales) infection in the wood cockroach, *Parcoblatta lata* (Dictyoptera: Blattodea: Blattellidae), with benomyl. *J. Invertebr. Pathol.* 85 (2004) 132–135.
- Gillespie J.P., Bailey A.M., Cobb B., Vilcinskas A. (2000). Fungi as elicitors of insect immune responses. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44, 49–68.
- Gołębiowski M., Boguś M., Paszkiewicz M. and Stepnowski P. (2011). Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. *Annals.Bioanal.Chem.* 399, 3177–3191.
- Gupta S.C., Leathers T.D., El-Sayed G. N., and Ignoffo C.M. (1991). Production of degradative enzymes by *Metarhizium anisopliae* during Growth on Defined Media and Insect Cuticle. *Exp. Mycol.* 15, 310-315.
- Gutierrez A. C., García J. J., Alzogaray R. A., Urrutia M. I. and López Lastra Claudia C. (2014). Susceptibility of different life stages of *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) and *Periplaneta fuliginosa* (Blattodea: Blattidae) to entomopathogenic fungi. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2014) 3(12): 614-621.
- Gutierrez A.C., Gołębiowski M., Pennisi M., Peterson G., García J. J., Manfrino R. and López Lastra C. C. (2015). Cuticle fatty acid composition and differential susceptibility of three species of cockroaches to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales). *J. Econ. Entomol.* 1–9 ; DOI: 10.1093/jee/tou096.
- Gutierrez A.C., Machado J.A.R, Hubner-Campos R., Pennisi M.A., Rodrigues J., López Lastra C.C., García J.J., Kamp Fernandes E.K. and Luz C. (2015). New insights

- into the infection of *Periplaneta americana* nymphs with *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). Enviado 29 de Junio a Bioc. Sc. Technol.
- Hammond P.M. (1995). Described and estimated species numbers: an objective assessment of current knowledge. In: Allsopp, D., Hawksworth, D.L. & Colwell, R.R. (Eds.). Microbial Diversity and Ecosystem Function. Wallingford. CABI.
- Hernández-Ramírez G., Hernández-Rosas F., Sánchez-Arroyo H., Alatorre-Rosas R., (2007). Infectividad, edad y humedad relativa relacionados con la susceptibilidad de ninfas y adultos de *Periplaneta americana* a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Entomotrópica. 22, 27-36.
- Hubner-Campos RF, Leles RN, Rodrigues J, Luz C. (2013). Efficacy of entomopathogenic hypocrealean fungi against *Periplaneta americana*. Parasitol.Intern. 62: 517-521.
- Humber R.A. (2012). Fungi: Identification. In: Manual of techniques in Invertebrate Pathology. L. Lacey (ed.). Chapter III. Academic Press, second edition. Pp. 75-96
- Hywel-Jones N.L. (1995). *Hymenostilbe ventricosa* sp. nov. a pathogen of cockroaches in Thailand. Mycol. Res. 99 (10): 1201-1204.
- Jackson L.L. (1970). Cuticular Lipids of Insects: II. Hydrocarbons of the Cockroaches *Periplaneta australasiae*, *Periplaneta brunnea* and *Periplaneta fuliginosa*. Lipids 5, 38-41.
- James R.R., Buckner J.S., Freeman, T.P. (2003). Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. J. Invertebr. Pathol. 84, 67-74.
- Kerwin J.L. (1984). Fatty acid regulation of the germination of *Erynia variabilis* conidia on adults and puparia of the lesser housefly, *Fannia canicularis*. Can. J. Microbiol. 30, 158-161.

- Lecuona RE. (1996a). Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Lecuona, R. E. (Ed.), M. Mas, Buenos Aires, Argentina..
- Lecuona RE. (1996b). Técnica empleadas con hongos entomopatógenos. En: Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Lecuona, R. E. (Ed.), M. Mas, Buenos Aires, Argentina. Pp. 143-150.
- Lacey L.A. y Brooks W.M. 1997. Manual of techniques in insect pathology. Ed. Lacey L.A., Academic Press Inc., San Diego, California. USA.
- Lockey K.H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. Comp. Biochem. Physiol. 89B, 595–645.
- López Lastra C.C., Hajek A.E. and Humber R.A. (2001). Effects of two cryopreservation techniques on viability and pathogenicity of entomophthoralean fungi. Can. J. Bot. 79: 861-864.
- Lopes R. B. & Alves S. B.. (2011). Differential susceptibility of adults and nymphs of *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Blattellidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and assessment of delivery strategies. Neotrop.Entomol. 40: 368–374.
- Majewski T. (1994). The Laboulbeniales of Poland. Polish Bot. Stud. 7: 1-466.
- Murali Mohan C.H., Aruna Lakshmi K., and Uma Devi K. (1999). Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). Biocontrol Sci. Technol. 9: 29–33.
- Pachamuthu P., Kamble S.T., and Yuen G. Y. (1999). Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Strain ESC-1 to the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and Its Compatibility with Insecticides. J. Econ. Entomol. 92,340-346.
- Quesada-Moraga E.R., Santos-Quiróz R, Valverde-García P. and Santiago-Álvarez C. (2004). Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of

- Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). J. Invertebr. Pathol. 87: 51–58.
- Richards A.G. & Smith M.N. (1956). Infection of cockroaches with *Herpomyces* (Laboulbeniales). II. Histology and hystopathology. Ann. Entomol. Soc. Am. 49, 85–93.
- Roth L.M. & Willis E.R. (1960). The biotic associations of cockroaches. Smithsonian Miscellaneous Collections 141, 1–470.
- Said I., Costagliola G., Leoncini I., Rivault C. (2005). Cuticular hydrocarbon profiles and aggregation in four *Periplaneta* species (Insecta: Dictyoptera). J. Insect Physiol. 51, 995–1003.
- Saito T. & Aoki J. (1983). Toxicity of free fatty acids on the larval surfaces of two Lepidopterous insects towards *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. And *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith (Deuteromycetes: Moniliales). Appl. Entomol. Zool. 18, 225–233.
- Santamaria S. (1998). Laboulbeniales, I. Laboulbenia. Flora Mycologica Iberica Vol. 4 C.S.I.C., J. Cramer. Madrid-Berlin-Stuttgart.
- Santamaria S. (2001). Los *Laboulbeniales*, un grupo enigmático de hongos parásitos de insectos. Lazaroa. 22: 3-19.
- Santamaría S. (2003). Laboulbeniales, II. Flora Mycologica Iberica vol. 5: 1-344. C.S.I.C., J.Cramer. Madrid-Berlin-Stuttgart.
- Shah P.A., Kooyman C. and Paraiso A. (1997). Survey for fungal pathogens of locust and grasshoppers in Africa and Near East. In: Goettel, M. & Johnson, D. (eds.). Microbial control of grasshoppers and locusts. Mem. Entom. Soc. Can. 171, 27-35.
- Singer T.L. (1998). Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. Am. Zool. 38, 394–405.

- Sosa-Gómez DR, Boucias DG, Nation JL. (1997). Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. J Invertebr Pathol. 69(1):31-9.
- Spegazzini C. (1915). Laboulbeniali ritrovate nelle collezioni di alcuni musei italiani. An. Mus. Nac. Hist. Nat. Buenos Aires. vol. 26, pp. 451-511.
- Spegazzini C.(1917). Revisión de las Laboulbeniales Argentinas. An. Mus. Nac. Hist. Nat. Buenos Aires. vol. 29, pp. 445-688.
- St. Leger R.J. (1991). Integument as a barrier to microbial infections. In: Physiology of the insect epidermis (eds K. Binnington & A. Retnakaran) pp 284-306 .CSIRO Publications, East Melbourne, Victoria, Australia.
- Tanada Y. & Kaya H. (1993). Insect Pathology.Academic Press, San Diego, California, USA. 666pp.
- Throne J.E., Weaver D.K., Chew V. and Baker J.E. (1995). Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. J. Econ. Entomol. 88: 1510–1512
- Vilčinskas A., Götz P. (1999). Parasitic Fungi and their Interactions with the Insect Immune System. Advan.Parasitol. 43, 267–313.
- Zar J. (1996). Biostatistical analysis.Third edition.Prentice Hall Upper, Saddle River, New Jersey.
- Zurek L., WesWatson D. and Schal C. (2002). Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and boric acid against the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). Biol. Control. 23: 296–302.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS



Conclusiones generales:

- *B. germanica* fue la mayor plaga domiciliaria de las especies de cucarachas recolectadas.
- Se describieron tres géneros de gregarinas *Blabericola* sp. y *Protomagalhaensia* sp. parasitando el intestino de *B. dubia* y *Gregarina* sp. en el intestino de *P. fuliginosa*. No se observó ninguna patología intestinal en las cucarachas asociadas a estos protistas.
- Se registró la presencia de un eucariota unicelular esporogénico en *Blatta orientalis*.
- Se identificó por medio de técnicas moleculares la bacteria *Wolbachia* en las cucarachas *B. dubia* y *P. nivea*. Siendo la primer cita de esta bacteria endosimbionte en las mencionadas especies de cucarachas.
- Fueron identificados dos nematodos *L. appendiculata* y *Hammerschmidtella* sp. en el intestino posterior de *P. fuliginosa*.
- Se detectó la presencia de tres especies de hongos ectoparásitos del género *Herpomyces* en las antenas de tres especies de cucarachas. *H. ectobiae* sobre *B. germanica*, *H. periplanetae* sobre *P. americana* y *H. stylopygae* sobre *P. fuliginosa*. Los hongos laboulbeniaes no afectaron el desarrollo y la reproducción de los mencionados insectos.
- Se registró la presencia natural de *M. anisopliae* s.l. en cucarachas silvestres siendo este el primer reporte a nivel mundial. Alcanzando el aislamiento cep424 un 76% de mortalidad para ninfas de *B. germanica*.
- Los aislamientos de *B. bassiana* CEP077 y *M. anisopliae* CEP085 obtenidos de la colección del CEPAVE fueron los más patogénicos sobre ninfas y adultos de *B. germanica*. La patogenicidad del aislamiento de *N. rileyi* fue baja produciendo escasa mortalidad en adultos y nula en ninfas y los aislamientos de *L. lecanii* e *I. fumosorosea* no causaron mortalidad.
- De los cuatro métodos probados en el laboratorio el contacto directo fue mejor método de control que el cebo para realizar estudios futuros a campo.
- Este es el primer estudio en laboratorio que evaluó la susceptibilidad de ninfas y de adultos de *B. orientalis* y *B. dubia* al aislamiento *M. anisopliae* cep085. Los adultos de *B. orientalis* no fueron susceptibles a dicho aislamiento. Indicando que la susceptibilidad al hongo *M. anisopliae* tuvo relación con la especie de

cucaracha analizada y las etapas de desarrollo del insecto.

- La cuantificación y la composición de los lípidos epicuticulares fue diferente en ninfas y adultos de la misma especie y a su vez entre especies de cucarachas. Estos lípidos podrían jugar un papel importante en la susceptibilidad de estos insectos a los hongos entomopatógenos.
- La producción de inóculo fúngico en sustrato arroz fue exitosa, alcanzando a los 14 días el máximo de producción de conidios. Aunque no funcionó como “cebo” de atracción para las cucarachas en estos resultados preliminares.

Conclusión final: Este estudio constituye un importante avance en el conocimiento de la diversidad de parásitos y patógenos de cucarachas aunque requiere ser profundizado. Evaluamos la patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre cucarachas y *M. anisopliae* podría llegar a ser un posible agente para el uso en el control biológico de cucarachas

Perspectivas futuras:

- Identificar a través de técnicas moleculares los aislamientos del hongo *M. anisopliae* s.l. aislados de cucarachas. Evaluar su patogenicidad sobre *P. fuliginosa* y *P. americana*.
- Profundizar el estudio de los mejores métodos de aplicación de los hongos entomopatógenos a campo.
- Estimar la composición total de lípidos cuticulares e identificar cuales están involucrados en la inhibición del hongo *M. anisopliae* en la cutícula de las cucarachas.
- Completar los análisis moleculares de *Wolbachia* y realizar la secuenciación de los fragmentos para determinar la filogenia de ésta bacteria en cucarachas.

ANEXO

ANEXO**ANTIBIÓTICOS:**

-Cloranfenicol 250mg/50ml agua destilada estéril.

-Gentamicina 25mg/50ml agua destilada estéril.

Ambos antibióticos fueron esterilizados por filtrado a través de filtros de 20 µm de diámetro (Fisherbrand). Usar 0,1ml de antibiótico por cada 100ml de medio de cultivo.

COLORANTES:**Azul de algodón-Lactofenol de Amann (Stevens, 1974):**

-Fenol (cristales) 20g

-Acido láctico 20g (16ml)

-Glicerol 40g (31 ml)

-Azul de algodón 0,05-1g

-Agua destilada 20g (20ml)

Coloración con Semichon ácido carmín para Gregarinas

-Fijación primaria. Fijar especímenes en los tejidos con AFA, y colocarlos en portaobjetos. Tenga en cuenta que Semichon es unfijador y puede ser utilizado para fijar y teñir de forma simultánea los frotis húmedos.

-Enjuague y fija. Enjuague el exceso de fijador con etanol 70% durante 3 minutos

-Teñir con Semichon de ácido carmín durante 2 minutos.

-Enjuague el exceso de colorante con etanol al 70% durante 3 minutos

-Decoloración primaria: Se decolora en alcohol ácido al 1%. El tiempo varía de 5 segundos a 5 minutos, dependiendo de especie y tamaño.

-Decoloración secundaria: Retire el exceso de tinte de fondo por inmersión en 5% de alcohol ácido (1-2 segundos).

-Enjuague con alcohol alcalino durante 3 minutos para neutralizar la decoloración ácido.

-Deshidratación en series escalonadas de etanol: 95% (5 minutos), 100% (3 cambios, 3-5 minutos cada uno).

-Aclarar en un gradiente de xileno o Tolueno en serie: 50% xileno/50% de alcohol absoluto (5 minutos); 100% dexileno (3 cambios, 3-5 minutos cada uno).

-Montaje. Montar en bálsamo Damar (Xileno Damar).

Tinción de hematoxilina-eosina para cortes histológicos

Esta técnica de tinción comprende el siguiente proceso:

- Hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Lavado con agua corriente. Diferenciación con alcohol-ácido. Lavado con agua corriente. Inmersión en agua amoniacal. Lavado con agua corriente (10-20 minutos). Tinción con eosina a temperatura ambiente. Inmersión en alcohol al 95 % para eliminar el exceso de eosina. Deshidratación y montaje en parafina.

BUFFER Y SOLUCIONES:

Solución Ringer (Woodring y kaya, 1988)

- Cloruro de sodio (NaCl) 9 g
- Cloruro de potasio (KCl) 0,4 g
- Cloruro de calcio (CaCl₂) 0,4 g
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0,2 g
- Agua destilada 1000 ml.

STE de 400 ml final :

- 8 ml de NaCl 100mM
- 4 ml de Tris-HCl 10 mM
- 0,8 ml de EDTA 1 mM
- 387,2 ml de agua destilada estéril.
- 400 ml volumen final.

NaCl 5M

- NaCl 29,22g
- Agua destilada 100 ml

Tris HCl 1M (pH=8)

- Tris base 121,1g
 - Agua destilada 100 ml
- Ajustar el pH hasta 8 con HCl concentrado.

EDTA 0,5M (pH=8)

- EDTA 18,61g
 - Agua destilada 100 ml
- Ajustar el pH hasta 8 con pastillas de NaOH.

Buffer TE

- Tris base 1,21g
 - EDTA 0,37g
 - Agua destilada 1000 ml
- Ajustar el pH hasta 8.

Buffer de corrida TBE 10X

- Tris base 108g
 - Ácido bórico 55g
 - EDTA 0,5M pH=8 7,78g
 - Agua destilada 1000 ml
- Ajustar el pH hasta 8,3.

En el momento de usar diluir 1:10 en agua destilada, para llegar a una concentración

1X.

Bromuro de etidio (1%)

- Bromuro de etidio 100mg
- Agua destilada 10 ml

FIJADORES

Fijador TAF (Courtney *et al.*, 1955) para nematodos.

- Formol al 40%, 7 ml
- Trietanolamina 2 ml
- Agua destilada 91 ml.

Fijador AFA (Alcohol-Formol-Ácido acético)

- Formol (al 40%) 60 ml.
- Ethanol (al 95%) 500 ml.
- Ácido acético glacial 40 ml.
- Agua destilada 400ml.

Líquido de Hoyer:

- Agua destilada 50ml
- Goma arábica (en trozos) 30gr.
- Hidrato de cloral (2,2,2-tricloroetano-1,1-diol) 200gr.
- Glicerina 20ml.

Se mezclan los ingredientes en el orden de la lista, hasta que se hayan integrado, por último se tamiza con una tela, procurando que no se hagan burbujas. Se conserva en un frasco de color ámbar.

MEDIOS DE CULTIVO

SABOURAUD DEXTROSA AGAR con 1% de extracto de levadura (SDYA) (Goettel e Inglis, 1997)

- Peptona 10g
- Dextrosa 20g
- Agar 20g
- Extracto de levadura 10g
- Agua destilada 1 litro

MEDIO de MAÍZ ADAMEK'S MODIFICADO (MMA) (Adamek, 1963)

- Caldo de maíz 3ml
- Extracto de levadura 4g
- Glucosa 4g

- Tween 80, 0.1% 2 ml
- Agua destilada estéril 95 ml

MEDIO SELECTIVO PARA AISLAR HONGOS ENTOMOPATÓGENOS
(Doberski y Tribe, 1980)

- Glucosa 40g
- Peptona (Difco) 10g
- Agar 15g
- Cristal violeta 0,01g
- Cicloheximida 0,25g
- Dodine (acetato de N-dodecilguanidinio) 0,25g
- Cloranfenicol 0,5g
- Agua destilada 1litro

Los antibióticos y antifúngicos se agregan al medio después de esterilización por autoclave cuando el medio está aún líquido a una temperatura por debajo de los 60 °C.

AGAR PAPA GLUCOSA (APG)

- Agar 20g
- Extracto de papa 250g papa
- Agua destilada 1000ml
- Glucosa 10g